

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003589

International filing date: 03 March 2005 (03.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-061291
Filing date: 04 March 2004 (04.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 6 1 2 9 1

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 6 1 2 9 1
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 株式会社カネカ

2 0 0 5 年 4 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	B040069
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12N 1/19 C12P 7/62
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県高砂市高砂町沖浜町4-2-21
【氏名】	大窪 雄二
【発明者】	
【住所又は居所】	兵庫県西宮市大森町11-33
【氏名】	松本 圭司
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都府中市栄町1-31-10
【氏名】	高木 正道
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県さいたま市プラザ57-2
【氏名】	太田 明德
【特許出願人】	
【識別番号】	000000941
【氏名又は名称】	鐘淵化学工業株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100086586
【弁理士】	
【氏名又は名称】	安富 康男
【選任した代理人】	
【識別番号】	100115141
【弁理士】	
【氏名又は名称】	野田 慎二
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	033891
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1
【包括委任状番号】	0003934

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

U R A 3 D N A 断片との相同的組換えにより、染色体 D N A の U R A 3 遺伝子が破壊されたウラシル要求性の遺伝子破壊酵母。

【請求項 2】

H I S 5 D N A 断片との相同的組換えにより、染色体 D N A の H I S 5 遺伝子が破壊されたヒスチジン要求性の遺伝子破壊酵母。

【請求項 3】

A D E 1 D N A 断片及び U R A 3 D N A 断片との相同的組換えにより、染色体 D N A の A D E 1 遺伝子及び U R A 3 遺伝子が破壊されたアデニン及びウラシル要求性の遺伝子破壊酵母。

【請求項 4】

A D E 1 D N A 断片及び H I S 5 D N A 断片との相同的組換えにより、染色体 D N A の A D E 1 遺伝子及び H I S 5 遺伝子が破壊されたアデニン及びヒスチジン要求性の遺伝子破壊酵母。

【請求項 5】

U R A 3 D N A 断片及び H I S 5 D N A 断片との相同的組換えにより、染色体 D N A の U R A 3 遺伝子及び H I S 5 遺伝子が破壊されたウラシル及びヒスチジン要求性の遺伝子破壊酵母。

【請求項 6】

A D E 1 D N A 断片、U R A 3 D N A 断片及び H I S 5 D N A 断片との相同的組換えにより、染色体 D N A の A D E 1 遺伝子、U R A 3 遺伝子及び H I S 5 遺伝子が破壊されたアデニン、ウラシル及びヒスチジン要求性の遺伝子破壊酵母。

【請求項 7】

酵母が、キャンディダ属、クラビスポラ属、クリプトコッカス属、デバリオマイセス属、ロデロマイセス属、メトシュニコウイア属、ピキア属、ロドスポリディウム属、ロドトルラ属、スポリディオボラス属、ステファノアスカス属、又はヤロウイア属のいずれかである請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子破壊酵母。

【請求項 8】

酵母がキャンディダ属である請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子破壊酵母。

【請求項 9】

酵母が、キャンディダ属の *a l b i c a n s* 種、*a n c u d e n s i s* 種、*a t m o s p h a e r i c a* 種、*a z y m a* 種、*b e r t a e* 種、*b l a n k i i* 種、*b u t y r i* 種、*c o n g l o b a t a* 種、*d e n d r o n e m a* 種、*e r g a s t e n s i s* 種、*f l u v i a t i l i s* 種、*f r i e d r i c h i i* 種、*g r o p e n g i e s s e r i* 種、*h a e m u l o n i i* 種、*i n c o m m u n i s* 種、*i n s e c t r u m* 種、*l a u r e l l i a e* 種、*m a l t o s a* 種、*m e l i b i o s i c a* 種、*m e m b r a n i f a c i e n s* 種、*m e s e n t e r i c a* 種、*n a t a l e n s i s* 種、*o r e g o n e n s i s* 種、*p a l m i o l e o p h i l a* 種、*p a r a p s i l o s i s* 種、*p s u d o i n t e r m e d i a* 種、*q u e r c i t r u s a* 種、*r h a g i i* 種、*r u g o s a* 種、*s a i t o a n a* 種、*s a k e* 種、*s c h a t a v i i* 種、*s e q u a n e n s i s* 種、*s h e h a t a e* 種、*s o r b o p h i l a* 種、*t r o p i c a l i s* 種、*v a l d i v i a n a* 種、又は *v i s w a n a t h i i* 種のいずれかである請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子破壊酵母。

【請求項 10】

酵母がキャンディダ・マルトーサ (*m a l t o s a*) である請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子破壊酵母。

【請求項 11】

キャンディダ・マルトーサ U-35 (FERM P-19435) である請求項 1 記載の U R A 3 遺伝子破壊酵母。

【請求項 12】

キャンディダ・マルトーサCH-I (FERM P-19434) である請求項2記載のHIS5遺伝子破壊酵母。

【請求項 13】

キャンディダ・マルトーサUA-354 (FERM P-19436) である請求項3記載のADE1遺伝子及びURA3遺伝子破壊酵母。

【請求項 14】

キャンディダ・マルトーサAH-I5 (FERM P-19433) である請求項4記載のADE1遺伝子及びHIS5遺伝子破壊酵母。

【請求項 15】

キャンディダ・マルトーサHU-591 (FERM P-19545) である請求項5記載のURA3遺伝子及びHIS5遺伝子破壊酵母。

【請求項 16】

キャンディダ・マルトーサAHU-71 (FERM P-19492) である請求項6記載のADE1遺伝子及びURA3遺伝子及びHIS5遺伝子破壊酵母。

【請求項 17】

同種又は異種の遺伝子を含むDNA配列で形質転換された請求項1～16のいずれか1項に記載の遺伝子破壊酵母の形質転換体。

【請求項 18】

請求項17に記載の形質転換体を培養して得られる培養物から、同種又は異種の遺伝子発現産物を採取することを特徴とする、遺伝子発現産物の製造方法。

【請求項 19】

遺伝子発現産物がポリエステルであることを特徴とする、請求項18記載の遺伝子発現産物の製造方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規遺伝子破壊酵母

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵母のある特定の染色体DNAを相同的組換えの原理により破壊した遺伝子破壊株に関する。また、当該破壊株を用いた産業上有用な物質の生産に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子組換え技術の発展により、原核生物や真核生物を利用して産業上有用な物質を大量に製造することが可能となった。真核生物のうち酵母でもサッカロミセス属は、古くから酒類等発酵性食品の生産に利用されてきたほか、キャンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) では、かつて微生物蛋白質として利用されたことがあり、酵母自体の安全性も確かめられている。

【0003】

酵母は増殖が速く、一般に細菌よりも高い細胞密度で培養することができる。さらに、酵母は、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、生産物の抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。こうした特性を生かして、酵母は、組換えDNAによる有用生産物の製造宿主として利用されており、その有用性が実証されている。

【0004】

種々の酵母のうち、キャンディダ属酵母はサッカロミセス属と異なり、好氣的条件下での培養でエタノールを生成せず、それによる増殖阻害も受けないことから、高密度での連続培養による効率的な菌体製造及び物質生産が可能である。さらに、無孢子酵母キャンディダ・マルトーサは、炭素鎖 $C_6 \sim C_{40}$ の直鎖炭化水素やバーム油、ヤシ油等の油脂を唯一の炭素源として資化・生育できるという特性を有している。この特性は、疎水性化学物質の変換による有用物質の生産や反応の場として実用上有利であることから、種々の化合物の生産への利用が期待されている（非特許文献1参照）。また、その特性を生かしてキャンディダ・マルトーサの遺伝子組換えによる有用物質の生産への利用も期待されており、そのための遺伝子発現系の開発が精力的に行われて来た（特許文献1, 2参照）。最近では、キャンディダ・マルトーサは、遺伝子組換えにより直鎖ジカルボン酸の生産（特許文献3参照）や生分解性プラスチック（特許文献4参照）に利用できることが公開されている。

【0005】

このように、キャンディダ・マルトーサ用の宿主ベクター系は早くから開発され、また、突然変異誘起処理により栄養要求性が付加された変異株が多数取得されているにもかかわらず、組換え体を用いた新たな有用化学物質生産の工業化はされていない。この理由に、野生株と同等の増殖能や直鎖炭化水素鎖の資化性能を持つ適当な栄養要求性を持ったキャンディダ・マルトーサが取得されていないことが挙げられる。キャンディダ・マルトーサを突然変異処理することによって開発されたCHA1株は、ADE1遺伝子とHIS5遺伝子に変異があることが確認されているが（非特許文献2参照）、増殖能が野生株より劣る。これは目的の箇所以外の変異によるものと考えられている。

【0006】

遺伝子組換えによる物質生産の宿主として酵母を用いる場合、大腸菌等を用いる場合と同様、目的遺伝子が導入されたことを確認することのできる選択マーカー（選択符号）を利用する。酵母の場合、薬剤耐性を付与する選択マーカー遺伝子としては、シクロヘキシミドやG418あるいはハイグロマイシンB等の耐性を付与する遺伝子等が用いられる。しかしながら、酵母に対して切れのよい薬剤がないため目的遺伝子の導入されていない菌も若干生育してしまう現象があること、徐々に薬剤耐性度が上昇すること等の問題が知られている。更に、酵母の菌株ごとにその薬剤耐性の程度は異なり、薬剤耐性を付与するために必要な薬剤耐性遺伝子の酵母中での発現量が異なってくる。そのため、個々の酵母に薬剤耐性を付与するためには、薬剤耐性遺伝子を発現させるためのプロモーターを適切に選

択、あるいは作成しなければならない。特にキャンディダ・マルトーサにおいてはシクロヘキシミド耐性を初めから持っており（非特許文献3参照）、その他先に述べた様な各種薬剤に対する耐性の程度も知られていない。更にキャンディダ・マルトーサをはじめとして一部の酵母種は、コドンの翻訳のされ方が大腸菌やヒト等の一般的な様式とは異なることが知られている（非特許文献4参照）。即ち、薬剤耐性遺伝子を直接使用することができない可能性が高い。

【0007】

そのため、適当な栄養要求性の選択マーカーが好んで使用される。栄養要求性の選択マーカーを利用するためには、栄養要求性の付加された変異株を取得する必要がある。従来、栄養要求性の付加には、ニトロソグアニンやエチルメタンスルホン酸等の変異源を用いたランダム変異誘起処理によって変異株を取得していた。しかし、この変異導入法では目的の栄養要求株が取得できるが、変異が目的の箇所以外にも入っている可能性が否定できない。この事が、先に述べたように酵母を宿主として開発する場合の障害となり、物質生産の場としての利用が、大腸菌等と比較して遅れている原因といえる。

【0008】

さらに、ランダム変異により取得された変異株のもう一つの問題点に、変異箇所の自然復帰がある。この場合、培養中に復帰株が優先的に増殖するため、組換え菌では物質生産性が低下することがある。また、復帰株は、自然界に流出した場合、生存・増殖する可能性が高く、安全規準の面から問題がある。従って、ランダム変異導入により取得した菌株を物質の生産の場として利用するのは適当でない。そこで、特定のアミノ酸やビタミン等の合成に関与する遺伝子のみが破壊された破壊株の取得が望まれており、ADE1遺伝子のみを破壊することにより栄養要求性を付加したキャンディダ・マルトーサとして、AC16株が作成された（特許文献5参照）。しかしながら、本菌株ではマーカーが1種類であることから導入できる遺伝子に限界があることが問題であった。

【0009】

酵母中に遺伝子を導入する方法には、プラスミドベクターを用いる方法と染色体遺伝子に組み込む方法がある。

酵母の菌体内で自律複製の可能な遺伝子であるプラスミドベクターは、1細胞に1コピー程度存在する型（YCp型）と、多コピー存在する型（YRp型）がそれぞれの酵母種に対して開発されつつある。後者のプラスミドベクターを用いる方が、目的遺伝子産物の発現量を増加させるのに有利であると考えられるが、一般的にはプラスミドベクターの安定性に問題があることが多く、産業上有利に利用することができない場合が多い。このような場合、YCp型を用い、目的遺伝子を発現させるためのプロモーターを強力なものにしたり、導入する遺伝子の数（コピー数）を増加させることが検討される。酵母でもプラスミドベクターを用いて遺伝子を導入する場合には、導入遺伝子の大きさに制限を受けることが知られている。用いるプラスミドベクターの種類により異なるが、複数種の遺伝子を導入したい場合や、単一の遺伝子でも複数個導入したい場合等、あまりにも大きなサイズの遺伝子を含むベクターは、ベクター作成上の困難さ、酵母へのベクターの導入効率の低下、酵母中での目的遺伝子の欠失等の点で産業上有利とはいえない。このような場合、染色体中に目的遺伝子を組み込むことにより解決することができる。また、染色体中に組み込んだ場合の方が、目的遺伝子が高発現する場合もある。しかしながら、選択マーカーが1種類しかない場合、1度その選択マーカーを用いてしまうと、もはやその遺伝子組換え株は選択マーカーが無く、複数回の遺伝子導入が不可能である。

これらのことから、栄養要求性マーカーを複数持つ遺伝子破壊酵母が望まれていた。

【0010】

先に述べたように、キャンディダ・マルトーサの変異株として、ADE1遺伝子やヒスチジノールーホスフェートアミノトランスフェラーゼ（HIS5遺伝子）、オロチジナー5'-ホスフェートデカルボキシレース（URA3遺伝子）等の遺伝子変異株が多数取得されている（非特許文献1参照）。しかし、ある特定の遺伝子のみを特異的に破壊することにより複数の栄養要求性を付加したキャンディダ・マルトーサは、同酵母が部分二倍体

を示すことから取得することが困難であった。このため、酵母の特性を利用し、かつ遺伝子組換えによる産業上有用な物質生産系を構築するためには、遺伝子破壊による複数の選択マーカーを有する宿主の開発が望まれていた。また、キャンディダ・マルトーサに限らず、そのような遺伝子破壊株が望まれている。

さらに、複数の選択マーカーを有するキャンディダ・マルトーサによる、直鎖炭化水素、バーム油、ヤシ油等の油脂を唯一の炭素源として資化・生育するという特性を生かした産業上有用な物質の生産が期待されている。

【0011】

【特許文献1】特開昭62-74287公報

【特許文献2】特開昭62-74288号公報

【特許文献3】国際公開第99/04014号パンフレット

【特許文献4】国際公開第01/88144号パンフレット

【特許文献5】特開2002-209574号公報

【非特許文献1】Wolf K. 編 Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook、Springer-Verlag、Berlin (1996) p411-580)

【非特許文献2】Kawai S. 等、Agric. Biol. Chem.、55: 59-65 (1991)

【非特許文献3】Takagi 等、J. Gen. Appl. Microbiol.、31: 267-275 (1985)

【非特許文献4】Ohama T. 等、Nucleic Acid Res.、21: 4039-4045 (1993)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、上記現状に鑑み、酵母、特にキャンディダ属において、多重栄養要求性遺伝子破壊株を構築することにより、種々の遺伝子を多数導入することができ、高効率に有用物質生産を行うことができる、産業上有益な新規宿主を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、遺伝子組換えの手法を駆使することにより、酵母のホスホリボシルアミノイミダゾールサクシノカルボキサミド合成酵素(EC6.3.2.6)をコードするDNA(ADE1遺伝子)、ヒスチジノール-ホスフェート-アミノトランスフェラーゼ(EC2.6.1.9)をコードするDNA(HIS5遺伝子)、及びオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシレース(EC4.1.1.23)をコードするDNA(URA3遺伝子)断片を用いた、染色体DNAとの相同的組換えの原理による、ADE1遺伝子、HIS5遺伝子及びURA3遺伝子破壊株の作製を行い、アデニン、ヒスチジン及びウラシル要求性の遺伝子破壊酵母の取得に成功した。そして、当該遺伝子破壊酵母の増殖能をキャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子破壊株のAC16と比較し、キャンディダ・マルトーサの突然変異処理によるADE1遺伝子変異株のCHA1より増殖能が優れていることが明らかにされているAC16株と同等であることを示すことにより、本発明を完成するに至った。

【0014】

即ち、本発明は、URA3 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのURA3遺伝子が破壊された酵母；HIS5 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのHIS5遺伝子が破壊された酵母に関する。同様に本発明は、ADE1遺伝子とURA3遺伝子が共に破壊された酵母；ADE1遺伝子とHIS5遺伝子が共に破壊された酵母；URA3遺伝子とHIS5遺伝子が共に破壊された酵母；ADE1遺伝子とURA3遺伝子とHIS5遺伝子が共に破壊された酵母に関する。

また、本発明は、同種又は異種の遺伝子を含むDNA配列で形質転換された上記遺伝子破

壊酵母の形質転換体に関する。

【0015】

さらに、本発明は、当該遺伝子破壊株に、複数の異種遺伝子発現系を導入した形質転換体を取得することにより、産業上有用な物質の生産方法を提供する。具体的には、一例として、本発明の当該遺伝子破壊キャンディダ・マルトーサ株に、生分解性ポリエステルとして有用性のある3-ヒドロキシブチレート（以下、3HBと略記する）と3-ヒドロキシヘキサノエート（以下、3HHと略記する）との2成分共重合ポリエステル（以下、P（3HB-co-3HH）と略記する）を合成する酵素であるポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子（以下、phaCと略記する）と、アセトアセチルCoA還元酵素遺伝子（EC1.1.1.36）（以下、phbBと略記する）を、好ましくは複数導入した当該形質転換体を用いて、P（3HB-co-3HH）を効率的に生産することに成功した。即ち、本発明は、遺伝子破壊酵母を用いた遺伝子発現産物（特にポリエステル）の製造方法であると同時に、ポリエステル生合成に関与する遺伝子を複数導入した形質転換体を用いるポリエステルの製造方法でもあって、上記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取するポリエステルの製造方法でもある。

【0016】

以下、本発明について詳細に説明する。

まず、本発明の遺伝子破壊酵母としては、以下のものが挙げられる。

URA3 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのURA3遺伝子が破壊されたウラシル要求性の遺伝子破壊酵母；

HIS5 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのHIS5遺伝子が破壊されたヒスチジン要求性の遺伝子破壊酵母；

ADE1 DNA断片及びURA3 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのADE1遺伝子及びURA3遺伝子が破壊されたアデニン及びウラシル要求性の遺伝子破壊酵母；

ADE1 DNA断片及びHIS5 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのADE1遺伝子及びHIS5遺伝子が破壊されたアデニン及びヒスチジン要求性の遺伝子破壊酵母；

URA3 DNA断片及びHIS5 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのURA3遺伝子及びHIS5遺伝子が破壊されたウラシル及びヒスチジン要求性の遺伝子破壊酵母；

ADE1 DNA断片、URA3 DNA断片及びHIS5 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのADE1遺伝子、URA3遺伝子及びHIS5遺伝子が破壊されたアデニン、ウラシル及びヒスチジン要求性の遺伝子破壊酵母。

【0017】

相同的組換えによるADE1遺伝子、URA3遺伝子、HIS5遺伝子の破壊を行う酵母には特に制限はなく、菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC等）に寄託されている酵母を使用することができる。好ましくは、直鎖炭化水素等の疎水性物質等の資化性の点で、キャンディダ属（*Candida*属）、クラビスボラ属（*Clavispora*属）、クリプトコッカス属（*Cryptococcus*属）、デバリオマイセス属（*Debaryomyces*属）、ロデロマイセス属（*Lodderomyces*属）、メトシュニコウィア属（*Metschnikowia*属）、ピキア属（*Pichia*属）、ロドスポリディウム属（*Rhodosporiidium*属）、ロドトルラ属（*Rhodotorula*属）、スポリディオボラス属（*Sporidiobolus*属）、ステファニアスカス属（*Stephanosascus*属）、ヤロウィア属（*Yarrowia*属）等の酵母を使用することができる。

これら酵母の中でも、特に、染色体遺伝子配列の解析が進んでおり、宿主ベクター系も利用できること、また、直鎖炭化水素や油脂等の資化能力が高い点で、キャンディダ属がより好ましい。

【0018】

キャンディダ属の中でも、特に直鎖炭化水素や油脂等の資化能力が高い点で、albicans種、ancudensis種、atmosphera種、azyma種、bertae種、blankii種、butyri種、conglobata種、dendronema種、ergastensis種、fluviatilis種、friedrichii種、gropengiesserii種、haemulonii種、incomunis種、insectrum種、laureliae種、maltosa種、melibiosica種、membranifaciens種、mesenterica種、natalensis種、oregonensis種、palmioleophila種、parapsilosis種、psudointermedia種、quercitrusa種、rhagii種、rugosa種、saitoana種、sake種、schatavii種、sequanensis種、shehatae種、sorbophila種、tropicalis種、valdiviana種、viswanathii種等を用いることがさらに好ましい。

これらの種の中でも、直鎖炭化水素を炭素源としたときの増殖速度や、albicans種等と異なり安全性が高いことから、特にマルトーサ(maltosa)種が好ましい。

【0019】

また、本発明のADE1、URA3、HIS5遺伝子破壊株の作製及びその利用に関して、酵母の好ましい1例として、キャンディダ・マルトーサを用いることができる。

本発明に用いるADE1遺伝子破壊酵母であるキャンディダ・マルトーサAC16株は、FERM BP-7366の受託番号で、平成12年11月15日付けで、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、ブダペスト条約に基づいて国際寄託されている。

また、後述のようにして本発明で得られた各遺伝子破壊酵母、つまり、

URA3遺伝子破壊酵母であるキャンディダ・マルトーサU-35株(受託番号FERM P-19435、寄託日平成15年7月18日)、

HIS5遺伝子破壊酵母であるキャンディダ・マルトーサCH-I株(受託番号FERM P-19434、寄託日平成15年7月18日)、

ADE1及びURA3遺伝子破壊酵母であるキャンディダ・マルトーサUA-354株(受託番号FERM P-19436、寄託日平成15年7月18日)、

ADE1及びHIS5遺伝子破壊酵母であるキャンディダ・マルトーサAH-I5株(受託番号FERM P-19433、寄託日平成15年7月18日)、

HIS5及びURA3遺伝子破壊酵母であるキャンディダ・マルトーサHU-591株(受託番号FERM P-19545、寄託日平成15年10月1日)、

ADE1及びHIS5及びURA3遺伝子破壊酵母であるキャンディダ・マルトーサAHU-71株(受託番号FERM P-19492、寄託日平成15年8月15日)、

はそれぞれ、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6にある独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

【0020】

ここで、相同的組換えとは、DNAの塩基配列が類似の配列又は同じ配列(相同配列)を持つ部分で起こる組換えを示す。

遺伝子破壊とは、ある遺伝子の機能が発揮できないようにするために、その遺伝子の塩基配列に変異を入れる、別のDNAを挿入する、あるいは、遺伝子のある部分を欠失させることを示す。遺伝子破壊の結果、その遺伝子がmRNAへ転写できなくなり、構造遺伝子が翻訳されない、あるいは、転写されたmRNAが不完全なため、翻訳された構造蛋白質のアミノ酸配列に変異又は欠失が生じ、本来の機能の発揮が不可能になる。

【0021】

ADE1遺伝子とは、プロモーター領域を含む5'非翻訳領域、ホスホリボシルアミノイミダゾールサクシノカルボキサミド合成酵素(EC6.3.2.6)をコードする領域、並びにターミネーター領域を含む3'非翻訳領域からなる遺伝子断片を示す。キャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子の塩基配列はGenBank:D00855に公開さ

れている。

【0022】

URA3 遺伝子とは、プロモーター領域を含む5' 非翻訳領域、オロチジナー5' ホスフェートデカルボキシレース (EC 4. 1. 1. 23) をコードする領域、並びにターミネーター領域を含む3' 非翻訳領域からなる遺伝子断片を示す。キャンディダ・マルトーサのURA3 遺伝子の塩基配列はGenBank: D12720に公開されている。

【0023】

HIS5 遺伝子とは、プロモーター領域を含む5' 非翻訳領域、ヒスチジノールホスフェートアミノトランスフェラーゼ (EC 2. 6. 1. 9) をコードする領域、並びにターミネーター領域を含む3' 非翻訳領域からなる遺伝子断片を示す。キャンディダ・マルトーサのHIS5 遺伝子の塩基配列はGenBank: X17310に公開されている。

【0024】

ADE1 DNA断片とは、微生物細胞内で染色体上のADE1 遺伝子と相同的組換えを起こすことができ、それによってADE1 遺伝子を破壊できるDNAを示している。

URA3 DNA断片とは、微生物細胞内で染色体上のURA3 遺伝子と相同的組換えを起こすことができ、それによってURA3 遺伝子を破壊できるDNAを示している。

HIS5 DNA断片とは、微生物細胞内で染色体上のHIS5 遺伝子と相同的組換えを起こすことができ、それによってHIS5 遺伝子を破壊できるDNAを示している。

【0025】

次に、本発明の形質転換体としては、上記遺伝子破壊酵母を、同種又は異種の遺伝子を含むDNA配列で形質転換したものである。

【0026】

同種遺伝子とは、宿主酵母の染色体上に存在している遺伝子又はその一部のDNAを意味する。異種遺伝子とは、宿主酵母の染色体上に本来存在しない遺伝子又はその一部のDNAを意味する。

【0027】

また、遺伝子発現カセットを用いることもできる。遺伝子発現カセットとは、転写プロモーターDNA配列、発現を目的とする遺伝子をコードするDNA、及び転写を終結するターミネーターを含むDNAから構成される環状プラスミド状のもので、染色体外で機能するものと、染色体DNAに組み込むタイプがある。

【0028】

次に、本発明の遺伝子発現産物の製造方法としては、上記形質転換体を培養して得られる培養物から、同種又は異種の遺伝子発現産物を採取するものである。

また、当該遺伝子発現産物としては、特にポリエステルであることが好ましい。

【0029】

遺伝子発現産物とは、遺伝子によって発現される物質（遺伝子発現物）が所望の蛋白質や酵素の場合、それ自体が遺伝子発現産物である。また、遺伝子発現物が各種酵素類や補酵素類であり、該酵素類が宿主酵母内で触媒活性を発現することにより生産される、遺伝子発現物とは直接異なる物質も遺伝子発現産物である。

【0030】

PHAとは、ポリヒドロキシアルカノエートの略であり、3-ヒドロキシアルカン酸の共重合した、生分解性ポリエステルを示す。

phaCは、3-ヒドロキシアルカン酸の共重合した生分解性ポリエステルを合成する、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を示す。

phbBとは、アセトアセチルCoAを還元して3-ヒドロキシブチリルCoAを合成する、アセトアセチルCoA還元酵素遺伝子を示す。

【0031】

以下に、ADE1、URA3、HIS5 遺伝子破壊株の作製方法、該破壊株によるポリエステルの製造方法を具体的に説明する。

(1) URA3 遺伝子破壊株、URA3・ADE1 遺伝子破壊株の作製方法

URA3 遺伝子破壊株作製に関しては、URA3 酵素が発現しない破壊株が得られればいかなる方法も用いることが可能である。遺伝子破壊の方法は種々の方法が報告されているが、ある特定の遺伝子のみ破壊できるという点で、相同的組換えによる遺伝子破壊が好ましい(Nickoloff J. A. 編 *Methods in Molecular Biology*, 47: 291-302 (1995), Humana Press Inc., Totowa, NJ)。相同的組換えの中でも、自然復帰しない破壊株が取得でき、その結果、組換え体を取り扱う上で安全性が高い菌株が得られるという点で、遺伝子置換破壊が好ましい。

【0032】

使用するURA3 DNA断片は、通常、遺伝子内部の部分DNAを除去し、残った両端部分を再度連結した形のDNA断片が用いられる。

除去する部分DNAは、除去によりURA3 遺伝子が酵素活性を発揮できなくなる部分であり、且つ自然復帰によりURA3 酵素活性が回復しない長さのDNAである。このような部分DNAの鎖長は特に限定されないが、好ましくは50塩基以上、より好ましくは100塩基以上である。また、除去されたDNAの部位にいかなる長さのDNAが挿入されていてもかまわない。

【0033】

これらDNA断片を作製するためには、例えば、PCR法(ポリメラーゼ連鎖反応法)や、ベクターからの制限酵素による切り出しと再連結によって調製できる。

URA3 DNA断片の両端の相同性領域長は、10塩基以上あればよく、好ましくは200塩基以上、より好ましくは300塩基以上である。

また、両端それぞれの相同性は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上である。

【0034】

URA3 遺伝子は、キャンディダ・マルトーサ染色体中に2個以上存在することが予想されていた。目的破壊遺伝子が破壊されたことを検出できる手法が存在する場合には選択マーカーは不要であるが、通常染色体中に2個以上ある遺伝子を破壊する場合等では、選択マーカーを指標として酵母染色体中の破壊対象遺伝子の相同組換えを検出する必要がある。複数の選択マーカーを用いるか、あるいは1個目の遺伝子を破壊した後、用いた選択マーカー遺伝子を除去あるいは破壊した後に、2個目以降の遺伝子を破壊する作業が必要となる。

【0035】

従って、URA3 DNA断片の除去した遺伝子部分に、ADE1等の選択マーカーとなり得る遺伝子を挿入する方法を用いることが出来る。挿入する選択マーカーの長さには特に制限はなく、酵母中で実質的に機能しうるプロモーター領域、構造遺伝子領域、ターミネーター領域を含んでいればよい。遺伝子マーカーが、目的酵母とは異なる生物由来でもかまわない。

【0036】

更に、選択マーカー遺伝子の両端に、hisG遺伝子断片(サルモネラ菌ATP phosphoribosyl transferase遺伝子の断片、この遺伝子断片を含むプラスミドpNKY1009はATCCより入手可能(ATCC: 87624))をそれぞれ挿入することで、遺伝子破壊を行った後に、分子内相同組換えにより挿入したマーカー遺伝子を除去可能にできる(Alanis等 *Genetics*, 116: 541-545 (1987))。このように選択マーカー遺伝子の除去に用いる遺伝子断片に特に制限はなく、選択マーカーの上・下流にいかなる遺伝子の相同断片を配置してもよい。従って、選択マーカーに含まれる配列を使用することも可能であり、本発明においては、マーカーとして用いるADE1遺伝子の5'末端部分の遺伝子断片をADE1遺伝子3'の末端に結合することで、分子内相同組換えによりマーカー遺伝子が極めて効率的に除去可能となった。マーカーの分子内相同組換えに用いる遺伝子断片に特に制限はなく、マーカー遺伝子が実質的に機能しない遺伝子断片を用いればよい。3'末端部分の遺伝子断片を用いることもできる。

【0037】

本発明では、3種類のURA3破壊用DNAを用いた。

URA3破壊用DNA-1は、約220bpのURA3酵素をコードするDNA断片を除去し、5'側約350bp DNA断片と3'側約460bpのDNA断片を連結したDNAである(図1)。除去した部分はURA3酵素蛋白質の約30%にあたる。また、5'側及び3'側のDNA断片と元のURA3遺伝子との相同性は両DNAとも100%である。

【0038】

URA3破壊用DNA-2は、URA3破壊用DNA-1の除去されたURA3 DNA断片の代わりに、キャンディダ・マルトーサ由来ADE1遺伝子を挿入した(図1)。

URA3破壊用DNA-3は、分子内相同組換えを起こしアデニン要求性を回復させる為の配列として、ADE1遺伝子の5'末端部分約630bpを用いることとし、ADE1遺伝子の下流に接続している(図1)。

【0039】

本発明に用いるDNA断片は、一般的なベクター上に構築することができる。

本発明においてはpUC-Nxを用いて行った。pUC-Nxは、pUC19 (Sambrook等編、Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 1.13, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))のEcoRIとHindIIIのサイトの間のDNAを、配列番号1に記載のDNAで置換し、制限酵素サイトを新規に構築したベクターである。

pUC119-URA3 (Ohkuma M.等、Curr. Genet., 23:205-210 (1993))より、PCRを用いてURA3遺伝子の5'側と3'側を別々に増幅し、pUC-Nxに順次連結し、URA3破壊用DNA-1を含むベクターを作成した。

次に、同ベクター中に、PCR法により増幅したADE1遺伝子を挿入し、このようにしてURA3破壊用DNA-2を含むベクターを作成した。

更に、このベクター中のADE1遺伝子3'末端に、PCRにより増幅したADE1 5'末端部分配列約630bpを挿入することにより、マーカー遺伝子除去が可能なURA3破壊用DNA-3を含むベクターが作成された。

【0040】

破壊用DNAを含むベクターは適当な大腸菌、例えばJM109やDH5 α に導入し、該大腸菌を培養し、それより塩化セシウム超遠心法により高純度のプラスミドを大量調製する(Sambrook等編、Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 1.42-1.47, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。また、アルカリ法等を用いても可能である(Brinbioim H.C.,等 Nucleic Acids Res. 7:1513-1523 (1979))。市販のプラスミド精製キット等を用いても十分可能である。このベクターを直接遺伝子破壊に用いることができるが、精製したベクターよりURA3領域を含む相同性のある部分を適当な制限酵素で切り出し、それを破壊用DNAとして利用するのが望ましい。PCR法を用いて増幅することも可能である。本発明では、制限酵素SphI及びSwaIで切断し、DNA断片を精製することなく菌体内に導入することにより、相同的組換えによってURA3遺伝子を破壊することができた。

【0041】

キャンディダ・マルトーサの形質転換法には、プロトプラスト法、酢酸リチウム法(Takagi M.等、J Bacteriol, 167:551-5 (1986))、電気パルス法(Kasuske A.等 Yeast 8:691-697 (1992))が知られているが、本発明では電気パルス法を用いて行った。電気パルス発生には市販の機器が利用できる。本発明では、BTX社(San Diego, CA USA)製のEL

ELECTRO CELL MANIPULATOR 600を用いた。キュベットはBIO MEDICAL CORPORATION CO. LTD (Tokyo Japan) 製のBM6200 (2mm gap blue cap)を用いた。

AC16株よりコンピテント細胞を調製し、URA3破壊用DNA-2と共に電気パルス後、アデニンを含まない培地で培養し、出現するコロニーより目的のURA3遺伝子にADE1遺伝子が挿入された破壊株をスクリーニングする。

【0042】

目的遺伝子破壊株のスクリーニングは、得られたコロニーから、PCR法やゲノミックサザンハイブリダイゼーション法 (Sambrook等編、Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 9.31-9.57, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))により容易に行うことができる。PCR法では、URA3遺伝子の両端をプライマーに用いると、アガロースゲル電気泳動において、野生株では正常な大きさのDNAバンドが検出されるが、破壊株では挿入遺伝子分だけ大きいバンドも検出される。本発明では、約1kbpと2kbpのDNAバンドが検出された。しかし、遺伝子破壊等の染色体DNAとの置換や組み込みの場合、遺伝子が目的以外の箇所、例えば相同性の高い未知の部分に挿入される可能性を想定すべきであり、その場合、PCR法では確認できない場合がある。この場合、ゲノミックサザンハイブリダイゼーション法や、破壊対象遺伝子の相同組換えに用いた部分より外部に存在する遺伝子配列を用いてPCR法を行うことにより、確認することが出来る。

【0043】

URA3遺伝子は、キャンディダ・マルトーサ染色体に2個以上存在することが予想された。実際、URA3破壊用DNA-2を形質転換して得られた株は、ウラシル要求性を示さず、2個目のURA3遺伝子を破壊しなければ、ウラシル要求性を付与する事ができない。2個目のURA3遺伝子を破壊するためには、挿入したADE1遺伝子を破壊した後、もう一度1個目のURA3遺伝子を破壊した手法を用いるか、あるいは、URA3破壊用DNA-1等で形質転換後、ウリジンあるいはウラシルと5-FOA (5-Fluoroorotic Acid)の共存下で生育してくるコロニーを選択することで達成される。本発明においては前者の手法を用いた。即ち、アデニン非要求性となった株にURA3破壊用DNA-1を電気導入し、アデニンを含む最少培地に塗布し、出現する赤色コロニーを選択することで、アデニン要求性株が取得できる。ADE1 DNA断片を用いることもできる (特開2002-209574号公報)。

【0044】

この際、スクリーニングを効率的に行うための濃縮工程を用いることが好ましい。例えば、ナイスタチン濃縮 (Snow R. Nature 211: 206-207 (1966)) と呼ばれる方法を利用することができる。本法は、酵母からランダム変異により得られる変異株を効率的に選択するために開発された方法であるが、遺伝子破壊株にも応用できる。例えば、遺伝子導入後、培養した菌体をYM培地等に植菌し培養する。菌を洗浄し、窒素源不含最少培地で培養後、窒素源含有最少培地で短時間培養する。この培養液に直接ナイスタチンを添加し、30℃で1時間、好氣的に培養することにより、野生株を優先的に殺傷できる。この菌液を、アデニンを含有する適当な寒天培地プレートに塗抹し、30℃で2日間程度培養すると、赤色コロニーが得られる。

【0045】

得られたアデニン要求性株は、PCR法により確認する事が出来る。URA3遺伝子の両端をプライマーに用いると、アガロースゲル電気泳動において、元株では正常な大きさのDNAバンドが検出されるが、ADE1破壊株では欠失部分だけ短いバンドも検出される。

【0046】

次に、このURA3遺伝子が1個破壊され、アデニン要求性を回復した株に対して、上記の方法を繰り返すことで2個目のURA3遺伝子が破壊され、ウラシル要求性となった株

を取得することができる。その後再びA D E 1遺伝子を破壊することで2重栄養要求性株を取得することができるが、本発明においては、2個目のU R A 3遺伝子の破壊には、分子内相同組換えによるマーカー遺伝子除去が可能なA D E 1遺伝子を含むU R A 3破壊用D N A－3を用いた。この破壊用遺伝子を、本株に電気導入し、ウリジンあるいはウラシルを含む選択培地にてコロニーを形成させる。得られたコロニーをウリジンやウラシルを含まない培地にレプリカする事により、ウラシル要求性株を選択する。得られた要求性株の染色体遺伝子をP C R法等により解析し、正常なU R A 3に相当する遺伝子が増幅せず、挿入遺伝子を含むサイズの遺伝子、及び、欠失を含むサイズの遺伝子のみを増幅する株を選択する。この段階でU R A 3破壊株が完成する。

【0047】

次に、挿入したA D E 1遺伝子を除去する。この方法として、分子内相同組換えによりA D E 1遺伝子を自然欠失した株を、ナイスタチン濃縮法を応用することにより、簡便に作成することが可能である。本発明の好ましい態様によれば、培養した菌体をY M培地等に植菌し培養後、菌を洗浄し、窒素源不含最少培地で培養後、窒素源含有最少培地で短時間培養する。この培養液に直接ナイスタチンを添加し、30℃で1時間、好氣的に培養することにより、A D E 1遺伝子を含む株を優先的に殺傷できる。この菌液をアデニンを含有する適当な寒天培地プレートに塗抹し、30℃で2日間程度培養すると、赤色コロニーが得られる。

【0048】

得られたアデニン要求性株は、P C R法等により確認する事が出来る。U R A 3遺伝子の両端をプライマーに用いると、アガロースゲル電気泳動において、元株では、A D E 1遺伝子とA D E 1断片遺伝子の挿入された大きさのD N Aバンドと欠失を持つU R A 3遺伝子の大きさのD N Aが検出されるが、A D E 1破壊株では、欠失を持つU R A 3遺伝子の大きさのD N Aと欠失を持つU R A 3遺伝子の大きさのD N AにA D E 1遺伝子断片の大きさを加えたサイズのD N Aバンドもが検出される。この段階でA D E 1及びU R A 3遺伝子破壊株が作成される。

【0049】

(2) H I S 5遺伝子破壊株、H I S 5・A D E 1遺伝子破壊株の作製方法
H I S 5遺伝子破壊酵母、及び、H I S 5・A D E 1遺伝子破壊酵母についても、上記(1)に記載の方法を用いてA C 1 6株より作成することが出来る。
用いるH I S 5遺伝子は、p U C 1 1 9－H I S 5 (H i k i j i . 等、C u r r . G e n e t . 、1 6 : 2 6 1－2 6 6 (1 9 8 9)) より調製することが出来る。即ち、A D E 1遺伝子の3'側にA D E 1遺伝子5'側断片を接続した遺伝子の両端に、H I S 5遺伝子の5'側D N A断片と3'側のD N A断片を連結したH I S 5遺伝子破壊用D N A等を用いることができる(図1)。本発明においては、H I S 5遺伝子の5'側及び3'側の約500bpのD N A断片を用いたが、特に限定されるものではない。

【0050】

上記遺伝子をA C 1 6株に電気導入し、得られたアデニン非要求性株よりH I S 5遺伝子が破壊された株をP C R法等により選択し、その後、ナイスタチン濃縮法により、分子内相同組換えによりアデニン要求性を回復した株を簡便に取得することができる。H I S 5遺伝子が複数存在する場合には、本工程を繰り返し行うことで、アデニン、ヒスチジン2重栄養要求性株が取得できる。

【0051】

(3) U R A 3・H I S 5遺伝子破壊株、U R A 3・H I S 5・A D E 1遺伝子破壊株の作製方法

(1)で得られたU R A 3・A D E 1破壊株を元にして、(2)に記載の方法で、U R A 3・H I S 5遺伝子破壊株、及びU R A 3・H I S 5・A D E 1遺伝子破壊株を作成することが出来る。また、(2)で得られた株を元にして、(1)の方法を用いても作成可能である。

【0052】

(4) 遺伝子破壊株による異種遺伝子発現

本発明で得た遺伝子破壊株を用いて、同種遺伝子あるいは異種遺伝子を、利用可能なマーカーの数に応じて複数回導入することや、マーカーを回復させることで何度でも導入することが可能となり、目的遺伝子を従来以上に導入でき多量に発現させることができる。

酵母は、大腸菌ではできない糖鎖付加蛋白質を培地中に分泌することができるため、遺伝子破壊株を用いてこのような蛋白質の生産が可能である。また、本発明の酵母は、遺伝子マーカーが複数存在するため、数種の蛋白質を発現させることができ、複数の酵素が関与するような複雑な反応を行うことも可能であり、化学品の製造にも有用である。

導入できる同種遺伝子は特に限定されないが、例えば、産業上有用な生産物の製造例として、WO 99/04014に公開されているような、キャンディダ・マルトーサに同株由来のP 450酵素遺伝子を導入することによる、ジカルボン酸の製造が挙げられる。

また、異種遺伝子も特に限定はされないが、例えば、抗体遺伝子、リパーゼ遺伝子、アミラーゼ遺伝子等の導入による、当該蛋白質の製造が挙げられる。ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子や、ポリヒドロキシアルカン酸合成の基質を合成する酵素遺伝子を導入することによる、ポリエステルの製造も挙げられる。

【0053】

酵母1細胞当たりの目的遺伝子の導入数は、目的遺伝子産物の性質と、用いるプロモーターの強さにより決定される。例えば、目的遺伝子産物が導入した発現カセットより翻訳される蛋白質の場合、単純蛋白質の場合は何個でもよいが、糖鎖を付加される蛋白質の場合、過剰な蛋白質の翻訳は糖鎖修飾が律速となり不均一な産物を与えることになる。従って、制限された数の発現カセットの導入が好ましい。

【0054】

本発明に用いたキャンディダ・マルトーサ等の一部のキャンディダ属酵母においては、mRNAから蛋白質が翻訳される段階で、一部コドンの翻訳のされ方が他の生物と異なっていることが知られている。キャンディダ・マルトーサではロイシンコドンのCUGがセリンに翻訳されるため(Ohama T.等、Nucleic Acid Res.、21:40394045(1993))、大腸菌由来lacZ遺伝子が、活性を持つβガラクトシダーゼに翻訳されない(Sugiyama H.等、Yeast 11:43-52(1995))。このように異種遺伝子が発現させる場合には、それがキャンディダ・マルトーサ内で機能を持つ蛋白質に翻訳されるという保証はない。従って、キャンディダ・マルトーサを宿主として異種遺伝子が発現させる場合、原則としてロイシンコドンのみ変換すれば良いが、さらに効率よく発現させるため他のアミノ酸コドンをキャンディダ・マルトーサのものに合わせても良い。コドンの変換は、例えばWolf K.編 Nonconventional Yeasts in Biotechnology.の中のMauersberger S.等著、Candida maltosa p524-527を参考にして行えば良い。

【0055】

本発明の好ましい実施形態では、遺伝子発現産物として生分解性ポリエステルが生産される。以下、ポリエステルの生産方法について記述する。

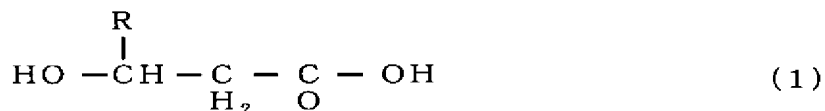
本発明においては、例えば、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子(phaC)や、ポリエステルの合成の基質となる分子の合成に関与する酵素遺伝子等のポリエステル合成に関与する酵素遺伝子を、上記遺伝子破壊酵母に複数組み込んで形質転換体とし、当該形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取する。

【0056】

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子としては特に限定されないが、下記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が好ましく、下記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)の合成に関与する酵素遺伝子であることがより好ましい。

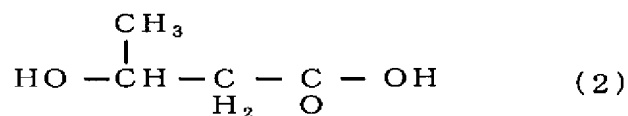
【0057】

【化1】



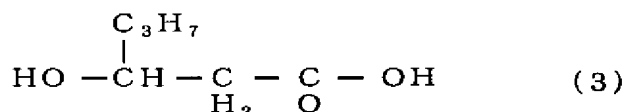
【0058】

【化2】



【0059】

【化3】



【0060】

例えば、特開平10-108682号公報に記載されているポリエステル合成酵素遺伝子を用いることができる。

【0061】

また、本ポリエステル合成酵素遺伝子と共に、ポリエステル合成の基質となる(R)-3-ヒドロキシブチリル-CoAや、(R)-3-ヒドロキシブチリヘキサノイル-CoAに関与する遺伝子を導入しても良い。

これらの遺伝子としては、例えば、 β 酸化経路の中間体のエノイル-CoAを(R)-3-ヒドロキシアシル-CoAに変換する(R)体特異的エノイル-CoAヒドラーゼ(Fukui T. 等、FEMS Microbiology Letters、170: 69-75 (1999)、特開平10-108682号公報)や、アセチル-CoAを二量化して3-ヒドロキシブチリル-CoAを合成する β ケトチオラーゼ、NADPH依存性リダクターゼ遺伝子(Peoples OP等、J. Biol. Chem. 264: 15298-15303 (1989))等が挙げられる。更に、3-ケトアシル-CoA-アシルキャリアープロテイン還元酵素(Taguchi K. 等、FEMS Microbiology Letters、176: 183-190 (1999))を用いることも有用である。

これらの遺伝子は、実質的な酵素活性を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていても良いものとする。但し、異種遺伝子の場合、上記したようにキャンディダ・マルトーサ内で機能を持つ蛋白質に翻訳されるという保証はないため、アミノ酸コドンを変更することが望ましい。

より好ましくは、ポリエステル合成酵素遺伝子とアセトアセチル-CoA還元酵素遺伝子と共に用いることができる。

【0062】

本発明では、アエロモナス・キャビエ由来のphaC(特開平10-108682公報、Fukui T. 等、FEMS Microbiology Letters、170: 69-75 (1999))と、ラルストニア・ユートロファ由来のphbB(GenBank: J04987)を用いた。

【0063】

アエロモナス・キャビエ由来のphaCをコードする遺伝子を、キャンディダ・マルトー

サで発現するように設計し、且つアミノ酸配列上アミノ末端より149番目に存在するアスパラギンをセリンに置換するように作成したDNA (p h a C a c 1 4 9 N S) の塩基配列を配列番号2に示した。

ラルストニア・ユートロファ由来のp h b Bをコードする遺伝子を、キャンディグ・マルトースで発現するように設計したDNAの塩基配列を配列番号3に示した。

【0064】

ただし、これらの配列番号に示した塩基配列は、これに限定されるものではなく、当該酵素のアミノ酸配列がキャンディグ・マルトース内で発現される塩基配列であれば、いかなる塩基配列でも用いることができる。より好ましくは、これらポリエステル合成に関与する遺伝子のカルボキシル末端にペルオキシソーム配向シグナルとして3つのアミノ酸配列から成る「(セリン／アラニン／システイン)－(リジン／アルギニン／ヒスチジン)－ロイシン」をコードする遺伝子を付加されているものを用いることができる。ここで、例えば、(セリン／アラニン／システイン)とはセリン、アラニン又はシステインのいずれかであるということを意味する(W O 0 3 / 0 3 3 7 0 7)。

【0065】

酵母における遺伝子発現カセットは、当該遺伝子の5'側上流に、プロモーター、5'上流域活性化配列(UAS)等のDNA配列を連結し、当該遺伝子の3'下流に、ポリA付加シグナル、ターミネーター等のDNA配列を連結して作製する。これらのDNA配列は、当該酵母で機能する配列であればどのような配列でも利用できる。

【0066】

使用するプロモーター、ターミネーターは、酵母で機能するものであればどのような配列でも利用できる。プロモーターには構造的に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがあるが、いずれのプロモーターも用いてもよい。本発明においては、上記プロモーター、ターミネーターが、キャンディグ・マルトースで機能するものであることが好ましく、上記プロモーター、ターミネーターが、キャンディグ・マルトース由来であることがより好ましい。さらに好ましくは、用いる炭素源で強い活性を持つプロモーターである。

例えば、油脂等を炭素源として用いる場合には、プロモーターとしては、キャンディグ・マルトースのALK1遺伝子(GenBank: D00481)のプロモーターALK1p(W O 0 1 / 8 8 1 4 4)、ALK2遺伝子(GenBank: X55881)のプロモーターALK2p等を用いることができる。更に、これらのプロモーターの上流にARR(アルカン レスポンシブル リージョン)配列を複数個付加することによりプロモーター活性を向上させたプロモーター(木暮ら、2002年日本農芸化学大会講演要旨集、p191)(配列番号4)を利用することもできる。また、ターミネーターとしては、キャンディグ・マルトースのALK1遺伝子のターミネーターALK1t(W O 0 1 / 8 8 1 4 4)等を用いることができる。

なお、上記プロモーター及び／又はターミネーターの塩基配列は、キャンディグ・マルトースで機能する配列であれば、1つ若しくは複数個の塩基が欠失、置換及び／又は、付加された塩基配列であってもよい。

上記プロモーターは、ペルオキシソーム配向シグナルをコードするDNAが付加されたポリエステル合成に関与する酵素をコードする遺伝子の5'上流に、ターミネーターは、ペルオキシソーム配向シグナルをコードするDNAが付加されたポリエステルの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の3'下流に、それぞれ連結される。

【0067】

プロモーター及びターミネーターと構造遺伝子を連結し、本発明の遺伝子発現カセットを構築する方法は、特に限定されるものではない。本実施例の他にも制限酵素部位を作成するためにPCR法も利用できる。例えば、W O 0 1 / 8 8 1 4 4に記載の方法が利用できる。

【0068】

この発現カセットを酵母染色体に部位特異的に組み込むためには、発現カセットと選択マーカーとなる遺伝子を結合させたDNAの両端に、導入する染色体遺伝子と相同な配列を

持つ遺伝子断片を結合させたDNA（導入用DNA）を用いることができる。選択マーカーとして、上記（１）に記載の分子内相同組換えにより自然欠失可能なADE1遺伝子等を利用する事も可能である。導入用DNA中の発現カセットの数には限定が無く、作成可能であればいくつでもよい。

【0069】

目的遺伝子を挿入させる場所としては、遺伝子配列の解明されている場所であればいかなる部位でも利用できる。遺伝子配列が未知であっても、遺伝子配列の知られた近縁種酵母の染色体遺伝子配列を元に遺伝子配列の解析が可能であるので、実質的に、全ての遺伝子部位への挿入が可能である。遺伝子配列の解析法としては、導入対象酵母染色体DNAライブラリーより、配列の解析されているサッカロマイセス・セレビシエや、キャンディダ・アルビカンズの相同遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーション法を用いて取得することができる。プローブは、PCR等を用いて作成できる。染色体DNAライブラリーは、当業者にとって公知の方法で作成できる。

【0070】

一例としては、（１）に記載のURA3遺伝子破壊に用いたURA3破壊用DNA-1中に、マーカー遺伝子としてHIS5遺伝子を挿入し、URA3遺伝子断片部位との間にポリエステル合成に関与する遺伝子の発現カセットを挿入すると、ヒスチジン要求性をマーカーとして、酵母染色体上の破壊されたURA3部位に特異的に目的遺伝子を挿入させるDNAを作成することができる。遺伝子の導入法としては、（１）に記載の電気導入法等が利用できる。

【0071】

本発明の菌株は、複数の選択マーカーを利用して、形質転換することにより、遺伝子発現カセットを複数導入した様々な株を作製することができる。分子内相同組換えにより自然欠失可能なADE1遺伝子等を利用すれば、選択マーカーの回復が可能であるので何カ所にも遺伝子導入が可能である。また、酵母内において自律複製可能なプラスミドも共に利用することができる。

【0072】

ポリエステル合成に関与する遺伝子発現カセットで形質転換された酵母を培養することによるポリエステルの製造は、次のようにして行うことができる。培養に用いる炭素源としては、酵母が資化できるものであればどのようなものでも良い。また、プロモーターの発現が誘導型である場合には、適時誘導物質を添加すれば良い。誘導物質が主要炭素源である場合もある。炭素源以外の栄養源としては、窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であれば良いが、20℃から40℃が好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すれば良い。

【0073】

本発明の好ましい形態としては、炭素源として、油脂類、脂肪酸類、アルコール類さらにはn-アルカン等を用いることができる。油脂類としては、例えばナタネ油、ヤシ油、パーム油、パーム核油等が挙げられる。脂肪酸類としては、ブタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸等の飽和・不飽和脂肪酸、またこれら脂肪酸のエステルや塩等の脂肪酸誘導体等が挙げられる。これらを混合して使用することもできる。また、資化ができないか又は効率よく資化できない油脂の場合、培地中にリパーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リパーゼ遺伝子を形質転換することにより、油脂資化能を付与することもできる。

【0074】

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス等が挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

その他の有機栄養源としては、例えば、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリン等のアミノ酸類；ビタミンB₁、ビタミンB₁₂、ビオチン、ニコチン酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等のビタミン類等が挙げられる。

また、誘導物質としては、グルコースやガラクトース等が挙げられる。

【0075】

ポリエステルの菌体からの回収は多くの方法が報告されている。本発明においては、例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液から、遠心分離器等で菌体を分離・回収し、その菌体を蒸留水及びメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この段階に菌体を破碎する工程を加えることもできる。この乾燥菌体から、クロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液から、濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。次いで、濾過や遠心分離によってその上澄み液を除去し、沈殿したポリエステルを乾燥させて、ポリエステルを回収することができる。

【0076】

得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法等により行うことができる。

【発明の効果】

【0077】

本発明の遺伝子破壊によって作成された複数のマーカーを有する酵母は、遺伝子組換え用宿主として、高効率な遺伝子発現や遺伝子の発現産物の製造に用いることが期待できる。また、本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを、酵母において効率的に生産することが可能になった。さらに、遺伝子破壊によるマーカーを付加することも可能であり、より優れた宿主の開発に繋がる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0078】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

なお、酵母菌の培養用に使用した試薬は、特に断らない限り和光純薬から販売されているものを用いた。

また、本発明の実施において、多くの市販のキットを用いたが、特に断らない限り添付の使用説明書に従って行った。

【0079】

(培地組成)

LB培地：10 g/Lトリプトン、5 g/L酵母エキス、5 g/L食塩。LBプレートの場合は、寒天を16 g/Lになるように加える。

YPD培地：10 g/L酵母エキス、20 g/Lポリペプトン、20 g/Lグルコース。

YPDプレートの場合は、寒天を20 g/Lになるように加える。アデニン含有YPD培地の場合は、アデニンを0.1 g/L加える。

YM培地：3 g/L酵母エキス、3 g/Lマルトエキス、5 g/Lバクトペプトン、10 g/Lグルコース。

SD培地：6.7 g/Lアミノ酸不含イーストニトロジェンベース(YNB)、20 g/Lグルコース。アデニン含有培地の場合はアデニンを24 mg/L添加する。ウリジン含有培地の場合はウリジンを0.1 g/L添加する。ヒスチジン含有培地の場合はヒスチジンを50 mg/L添加する。SDプレートの場合は寒天を20 g/Lになるように加える。

【0080】

M培地：0.5 g/L硫酸マグネシウム、0.1 g/L食塩、0.4 mg/Lチアミン、0.4 mg/Lピリドキシン、0.4 mg/Lパントテン酸カルシウム、2 mg/Lイノシトール、0.002 mg/Lビオチン、0.05 mg/L塩化鉄、0.07 mg/L硫

酸亜鉛、0.01mg/L、ホウ酸、0.01mg、硫酸銅、0.01mg、ヨウ化カリウム、87.5mg/L、リン酸2水素カリウム、12.5mg/L、リン酸1水素2カリウム、0.1g/L、塩化カルシウム、20g/L、グルコース。硫酸アンモニウム含有M培地の場合は、1g/Lの硫酸アンモニウムを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン含有M培地の場合は、M培地に1g/Lの硫酸アンモニウムと24mg/Lのアデニンを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン・ウリジン含有M培地の場合は、M培地に1g/Lの硫酸アンモニウムと24mg/Lのアデニンと0.1g/Lのウリジンを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン・ヒスチジン含有M培地の場合は、M培地に1g/Lの硫酸アンモニウムと24mg/Lのアデニンと50mg/Lのヒスチジンを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン・ウリジン・ヒスチジン含有M培地の場合は、M培地に1g/Lの硫酸アンモニウムと24mg/Lのアデニンと0.1g/Lのウリジンと50mg/Lのヒスチジンを加える。

【0081】

M2培地（12.75g/L硫酸アンモニウム、1.56g/Lリン酸2水素カリウム、0.33g/Lリン酸1水素カリウム・3水和物、0.08g/L塩化カリウム、0.5g/L塩化ナトリウム、0.41g/L硫酸マグネシウム・7水和物、0.4g/L硝酸カルシウム・7水和物、0.01g/L塩化鉄（III）・4水和物）に、2w/v%パームオイルと塩酸に溶解したトレースエレメント（1g/mL硫酸鉄（II）・7水和物、8g/mL硫酸亜鉛（II）・7水和物、6.4g/mL硫酸マンガン（II）・4水和物、0.8g/mL硫酸銅（II）・5水和物）0.45mL/Lを添加する。炭素源として、油脂を20g/L添加する。

【0082】

酵母の液体培養は、50mL試験管、500mL坂口フラスコ、2L坂口フラスコあるいはミニジャーを用いて行った。50mL試験管の場合300rpm、500mL坂口フラスコの場合100～110rpm、2L坂口フラスコの場合90～100rpmで振とう培養した。培養温度は、液体培養とプレート培養ともに30℃である。

【0083】

（制限酵素処理）

制限酵素処理は、メーカーの推奨する反応条件、あるいはSambrook等編、Molecular cloning: A Laboratory Manual、Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989）に記載の方法に従って行った。

【0084】

（実施例1）相補ベクター及び破壊用遺伝子の作成

東京大学より分与されたURA3遺伝子をマーカーとして持つキャンディダ・マルトーサ用ベクターであるpUTU-1を、配列番号5及び6に記載のプライマー（del-sal-5、del-sal-3）を用いて、Stratagene社製クイックチェンジキットにより、URA3遺伝子中のSalI制限酵素サイトを破壊したベクターpUTU-del-salを作成した。このpUTU-del-salから、SalIとXhoIでURA3遺伝子を切り出し、切り出した断片を再びpUTU-1のXhoIサイトに導入したプラスミドpUTU-2を作成した。pUTU-1（WO01/88144に記載）上のADE1遺伝子を、pUTU-2のXhoIサイトにクローニングし、pUTU-2-Adeを作成した。pUTU-1のマルチクローニングサイトのSalIサイトに、pUC119にクローニングされていたHIS5遺伝子をクローニングし、pUTU1-Hisを作成した。更に、pUTU-2-AdeのマルチクローニングサイトのSalIサイトに、HIS5遺伝子をクローニングし、pUTU-2-Ade-Hisを作成した。

【0085】

pUC19のマルチクローニングサイトをNotI-SphI-SalI-XhoI-NheI-SwaI-EcoRIに変更したプラスミドpUC-NxのSphI-SalIサイトに、URA3遺伝子の5'末端部分約350baseを、配列番号7及び8に記載

のプライマー (ura-sph-5, ura-sal-3) を用いて、プラスミド pUTU-del-sal より増幅しクローニングした。このベクターの Nhe I-Swa I サイトに、URA3 遺伝子の 3' 末端部分約 460 base を、配列番号 9 及び 10 に記載のプライマー (ura-nhe-5, ura-swa-3) を用いて、PCR 増幅しクローニングした。このようにして、URA3 破壊用 DNA-1 を含むプラスミドを作成した。

【0086】

次に、URA3 破壊用 DNA-1 を含むプラスミドの Sal I-Xho I サイトに、pUTA-1 の ADE1 遺伝子全長を、配列番号 11 及び 12 に記載のプライマー (ade-sal-5, ade-xho-3) を用いて PCR 増幅・挿入して、URA3 破壊用 DNA-2 を含むプラスミドを作成した。

【0087】

URA3 破壊用 DNA-3 を含むプラスミドは、ADE1 遺伝子の 5' 末端部分約 630 base を、配列番号 13 及び 14 に記載のプライマー (ade-xho-5, ade-nhe-3) を用いて PCR 増幅し、URA3 破壊用 DNA-2 を含むプラスミドの Xho I-Nhe I サイトにクローニングして完成させた。

【0088】

HIS5 破壊用 DNA を含むプラスミドは、pUC119 にクローニングされている HIS5 遺伝子の 5' 末端部分約 500 base を配列番号 15 及び 16 に記載のプライマー (his-sph-5, his-sal-3) を用いて、HIS5 遺伝子の 3' 末端部分約 560 base を配列番号 17 及び 18 に記載のプライマー (his-nhe-5, his-swa-3) を用いて、URA3 破壊用 DNA-3 を含むプラスミドの Sph I-Sal I サイト、Nhe I-Swa I サイトを入れ替える形で、それぞれ順次クローニングする事により作成した。

【0089】

(実施例 2) AC16 株の URA3 遺伝子破壊

AC16 株を 10 ml の大試験管で YPD 培地で終夜培養した。この前培養した酵母を 1 ml / 100 ml 坂口フラスコとなるよう YM 培地に植菌し、6 時間培養後、集菌した。菌を 20 ml の 1M Sorbitol に懸濁し、3 回洗浄した。最後に菌体を 1M Sorbitol 0.5 ml に懸濁し、コンピテント細胞とした。このコンピテント細胞 0.1 ml に、実施例 1 の URA3 破壊用 DNA-2 を含むプラスミドを Sph I と Swa I で制限酵素処理した DNA を 0.1 mg 加え、電気パルス法による遺伝子導入を行った。電気パルスをかけた後、キューベットの 1M Sorbitol を 1 ml 入れ、氷冷下 1 時間放置し、SD プレートに蒔いた。出現したコロニーより、染色体抽出キットのジェントルくん (宝酒造社製) を用いて染色体 DNA を抽出した。得られた染色体 DNA 5 µg ずつを、3 種類の方法 Sca I、EcoT14 I、Sca I+EcoT14 I で制限酵素処理して切断し、0.8% アガロースゲルで電気泳動を行った。Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 9.31-9.57、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に従って、ゲルからハイボンド N+ フィルター (アマシャム社製) に 1 晩トランスファーした。サザンブロット検出用プローブは、URA3 遺伝子内の配列である Sca I-Nde I 断片 (340 bp) を、Gene Image ラベリング・検出キット (アマシャム社製) で酵素標識したものをを用いた。ハイブリダイズ後、洗浄し、同キットの蛍光発色試薬で DNA バンドを検出した。検出バンドを野生株 IAM12247 のものと比較したところ、野性株では約 570 bp のバンドを示す Sca I+EcoT14 I 処理した DNA が新たに ADE1 遺伝子の URA3 遺伝子中への挿入を示す 1840 bp のバンドも示す株を選択した。この株は、Sca I や EcoT14 I 処理のバンドでも理論値を示し、URA3 遺伝子の一つが ADE1 遺伝子により正確に破壊されたと確認された。

【0090】

次に、この株より上記と同様に調製したコンピテント細胞に、URA3 破壊用 DNA-2 を含むプラスミドを配列番号 7 及び 10 に記載のプライマーで PCR 法により増幅した D

NAを0.5mg加え、上記と同様に電気パルス法による遺伝子導入を行った。パルスを加えた後にYM培地100mlに植菌し、1晩培養した。菌体を回収し、M培地（硫酸アンモニウムなし）で1晩培養した。菌体回収後、M培地（硫酸アンモニウム有り）に移し、6時間晩培養後に、ナイスタチンを終濃度0.01mg/mlになるように加え、更に1時間培養した。菌体を洗浄し、菌体をアデニン入りSDプレートにスプレッドした。出現した赤色コロニーよりゲノムDNAを抽出した。ここで得られたアデニン要求性株のゲノムは、配列番号19及び20に記載のプライマーura3-5とura3-3を用いて増幅を行ったところ、元株でインタクトなURA3遺伝子の0.9kbpの増幅と共に増幅する2.3kbpのDNAが消失し、代わりに0.7kbpのDNAが増幅した。配列番号21及び22に記載のプライマーadeY110-5とadeY1670-3を用いて増幅を行ったところ、1.0kbpのDNAのみが増幅した。これらのことから、部位特異的に1つ目のURA3遺伝子破壊に用いたADE1遺伝子全領域が特異的に除去されていると判断した。このアデニン要求性株の内一株をU-1株と命名し、以下の実験に用いた。

【0091】

次に、U-1株を用いて得られたクローンを用いて、コンピテント細胞を調製した。このコンピテント細胞0.1mlに、URA3破壊用DNA-3を含むプラスミドを制限酵素SphIとSwaIで処理し精製したDNAを0.04mg加え、電気パルス法による遺伝子導入を行った。この菌体を、ウリジンを含むSDプレートにスプレッドし、30℃でインキュベートした。出現したコロニーを、SDプレートとウリジンを含むSDプレートにレプリカし、ウラシル要求性株を選択した。これより染色体DNAを回収し、配列番号19及び20に記載のプライマーura3-5とura3-3を用いてPCR増幅を行ったところ、インタクトなURA3遺伝子の0.9kbpのバンドが消失し、代わりにURA3破壊用DNA-3のサイズである2.9kbpが増幅していた。配列番号21及び22に記載のプライマーadeY110-5とadeY1670-3を用いて増幅を行ったところ、元株では増幅しないADE1遺伝子1.5kbpが増幅した。これらのことから、URA3遺伝子特異的に破壊用遺伝子3が導入され、URA3遺伝子が全て破壊され、ウラシル要求性を獲得したものと判断した。得られた株の栄養要求性は、ベクターpUTU-2で相補されることを確認した。このウラシル要求性株をキャンディダ・マルトーサU-35と命名した。

【0092】

次に、キャンディダ・マルトーサU-35株をYPD培地10mlで終夜培養した。集菌後、M培地（硫酸アンモニウムなし）で1晩培養した。菌体回収後、ウリジン含有M培地（硫酸アンモニウムあり）に移し、7時間晩培養後にナイスタチンを終濃度0.01mg/mlになるように加え、更に1時間培養した。菌体を洗浄後、アデニン及びウリジン含有M培地（硫酸アンモニウムあり）で1晩培養した。菌体を回収し、M培地（硫酸アンモニウムなし）で1晩培養後、ウリジン含有M培地（硫酸アンモニウムあり）に移して7時間培養し、先ほどと同様にナイスタチン処理を行い、アデニン及びウリジンを含むSDプレートにスプレッドした。培養後、得られた赤色コロニーを、SDプレート、ウリジンを含むSDプレート、並びにアデニン及びウリジンを含むSDプレートにレプリカし、アデニンとウラシルの両栄養要求性を示すクローンであることを確認した。この株よりゲノムDNAを抽出し、配列番号19及び20に記載のプライマーura3-5とura3-3を用いてPCR増幅を行ったところ、URA3遺伝子にADE1遺伝子が導入された2.9kbpのバンドが消失し、代わりにURA3遺伝子中にADE1遺伝子断片が残ったサイズである1.2kbpが増幅していた。配列番号21及び22に記載のプライマーadeY110-5とadeY1670-3を用いて増幅を行ったところ、親株では増幅するADE1遺伝子1.5kbpが増幅したが、得られた栄養要求性株は、元々のADE1破壊遺伝子のサイズである1.0kbpのバンドのみを認めた。これらのことから、URA3遺伝子中のADE1遺伝子とADE1遺伝子断片が同一遺伝子内で相同組換えにより自然にADE1遺伝子を失ったものであり、簡便に遺伝子マーカーが回復されることが示された。このアデニン・ウラシルの2重栄養要求性株をキャンディダ・マルトーサUA-354と命名した。

【0093】

(実施例3) AC16株のHIS5遺伝子破壊

実施例2で作成したU-1株よりコンピテント細胞を調製し、HIS5破壊用DNAを含むプラスミドを制限酵素SphIとSwaIで処理し精製したDNA0.04mgを加え、電気パルス法による遺伝子導入を行った。条件は実施例2と同じである。この菌体を、ヒスチジン含有SDプレートにスプレッドし、30℃でインキュベートした。出現したコロニーよりゲノムDNAを回収した。HIS5遺伝子中の破壊用遺伝子のHIS5遺伝子と相同性のある部分のフランキング部位のプライマー、即ち破壊用遺伝子には含まれていないHIS5遺伝子のプライマーであるhis-sal2とhis-1900(配列番号23及び24)を用いてゲノムDNA増幅を行ったところ、インタクトなHIS5遺伝子のサイズである1.9kbpのバンドと共にHIS5破壊用DNAのサイズである3.4kbpが増幅する株を選択した。

【0094】

この株を用い、実施例2に示した方法と同様の方法でナスタチン濃縮を行った。アデニン含有SDプレートにスプレッドし、得られた赤色コロニーよりゲノムDNAを抽出し、プライマーhis-sal2とhis-1900(配列番号23及び24)を用いてゲノムDNA増幅を行ったところ、インタクトなHIS5遺伝子のサイズである1.9kbpのバンドのみの増幅を認め、破壊用遺伝子を含んだサイズである3.4kbpは増幅しなかった。プライマーade-xho-5とhis-swa-3(配列番号13及び18)を用いてPCR増幅を行ったところ、HIS5遺伝子にADE1遺伝子断片が結合した1.2kbpのバンドが増幅していた。このことから、得られたアデニン要求性株は、リバータントではなく、分子内相同組換えの結果得られたものであると確認された。

【0095】

次に、得られたアデニン要求性株よりコンピテント細胞を調製し、HIS5破壊用DNAを含むプラスミドを制限酵素SphIとSwaIで処理し精製したDNA0.05mgを加え、電気パルス法による遺伝子導入を行った。この菌体を、ヒスチジンを含有SDプレートにスプレッドし、30℃でインキュベートした。出現コロニーを、SDプレートとヒスチジンを含有SDプレートにレプリカし、ヒスチジン要求性株を得た。得られたヒスチジン要求性株よりゲノムDNAを抽出し、プライマーhis-sal2とhis-1900(配列番号23及び24)を用いてゲノムDNA増幅を行ったところ、親株で増幅する破壊されたHIS5遺伝子のサイズである1.9kbpのバンド以外に破壊用遺伝子を含んだサイズである3.4kbpが増幅する株を選択した。この株は、プライマーhis-sal2とade-xho-3(配列番号23及び12)を用いたPCRにより、HIS5遺伝子中にADE1遺伝子が組み込まれたことを確かめた。このヒスチジン要求性株をキャンディダ・マルトーサCH-I株と命名した。

【0096】

CH-I株を用い、実施例2に示した方法と同様の方法でナスタチン濃縮を行った。アデニン及びヒスチジン含有SDプレートにスプレッドし、得られた赤色コロニーよりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAをプライマーhis-sal2とhis-1900(配列番号23及び24)を用いてゲノムDNA増幅を行ったところ、すべての株で親株の破壊されたHIS5遺伝子のサイズである1.9kbpのバンドのみの増幅を認め、破壊用遺伝子を含んだサイズである3.4kbpは増幅しなかった。ヒスチジン及びアデニン要求性を、SDプレート、ヒスチジン含有SDプレート、並びにアデニン及びヒスチジン含有SDプレートにレプリカする事で確認し、アデニン・ヒスチジンの2重栄養要求性株の完成とした。この内の1株をキャンディダ・マルトーサAH-I5株と命名した。

【0097】

次に、AH-I5株よりコンピテント細胞を調製し、URA3破壊用DNA-3を含むプラスミドを制限酵素SphIとSwaIで処理し精製したDNAを0.025mg加え、電気パルス法による遺伝子導入を行った。この菌体を、ウリジンとヒスチジンを含有SDプレートにスプレッドし、30℃で2日間インキュベートした。出現コロニーを、ヒスチジンを含有SDプレートと、ウリジンとヒスチジンを含有SDプレートにレプリカし、ウ

ラシル要求性株を選択した。これより染色体DNAを回収し、プライマーura3-5とura3-3（配列番号19及び20）を用いてPCR増幅を行ったところ、インタクトなURA3遺伝子の0.9 kbpのバンドが消失し、代わりに破壊用遺伝子のサイズである2.9 kbpの増幅を確認した。このヒスチジン・ウラシル2重要要求性株の内の1つを、キャンディグ・マルトーサHU-591と命名した。

【0098】

HU-591株を用い、実施例2に示した方法と同様の方法でナイスタチン濃縮を行った。アデニン、ヒスチジン及びウリジン含有SDプレートにスプレッドし、得られた赤色コロニーよりゲノムDNAを抽出した。プライマーura3-5とura3-3（配列番号19及び20）を用いてPCR増幅を行い、URA3遺伝子にADE1遺伝子が導入された2.9 kbpのバンドが消失し、代わりにURA3遺伝子にADE1遺伝子断片が残ったサイズである1.2 kbpが増幅している株を選択した。ウラシル及びヒスチジン及びアデニン要求性を、アデニン、ヒスチジン及びウリジン含有SDプレート、ヒスチジン及びウリジン含有SDプレート、アデニン及びウリジン含有SDプレート、アデニン及びヒスチジン含有SDプレート、アデニン含有SDプレート、ヒスチジン含有SDプレート、ウリジン含有SDプレート、及びSDプレートにレプリカする事で確認し、アデニン・ヒスチジン・ウラシルの3重栄養要求性株を完成した。この株をキャンディグ・マルトーサAHU-71と命名した。

【0099】

（実施例4）油脂資化能の確認

最終的に完成した3重栄養要求性株であるAHU-71株を用いて、油脂を炭素源としたときの生育に問題がないことを確認するために、ジャー培養を実施した。AHU-71株にプラスミドpUTU2-Ade-Hisを形質転換し、SDプレートにコロニーを形成させた。対照としてはAC16株にプラスミドpUTA-1を形質転換したのを用いた。種母は、150 mlのSD培地を用い、坂口フラスコで培養し、調製した。ジャー培養は、マルビシ社製3 Lジャーファーマンターに1.8 LのM2培地を仕込んで行った。温度は32℃、攪拌数は500 rpmとし、通気量は1vvmとした。炭素源はパーム核オイルを、培養開始より11時間目までは1.9 ml/hで、24時間目までは3.8 ml/hで、それ以降は5.7 ml/hでフィードした。経時的に10 mlの培養液をサンプリングし、メタノールで洗浄後、乾燥させ、ドライ菌体量を測定した。図2に示すように、AHU-71株は、AC16株と同様の生育を示した。このことより、本株が油脂資化能を損なうことなく遺伝子破壊が出来ていることが確認された。

【0100】

（実施例5）ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットの構築

キャンディグ・マルトーサでポリエステル合成酵素を発現させるために、それぞれの5'上流にキャンディグ・マルトーサ由来プロモーターを、3'下流にターミネーターを連結した。プロモーターとしては、ALK2遺伝子（GenBank: X55881）のプロモーターの上流にARR配列を付加したプロモーターARRpを、3'下流には共にキャンディグ・マルトーサのALK1遺伝子（GenBank: D00481）のターミネーターALK1tを連結した。ARRpは、東京大学より分与された遺伝子（配列番号4）のPstIサイトにEcoRI-XhoIリンカーを結合させ、EcoT14Iサイトに配列番号25に示した合成DNAを結合させることにより、XhoI及びNdeIで切り出すことの出来る形に変換した。pUAL1（WO01/88144）をEcoRIで切断後、平滑末端化しライゲーションを行うことにより、EcoRI切断部位を除去したpUAL2を作成した。pUAL2をPuvII/PuvIで切断し、pSTV28（宝酒造社製）のSmaI/PuvIIサイトに結合させ、pSTAL1を作成した。このpSTAL1をEcoRI/NdeIで切断し、先に述べたARRpと結合させ、pSTARを作成した。

【0101】

配列番号2に記載のphaCac149NSに、ペルオキシソームに配向するように、カ

ルボキシ末端にペルオキシソーム配向シグナルを付加した。付加したペルオキシソーム配向シグナルとしては、カルボキシ末端にSer-Lys-Leu (SKL) のアミノ酸を使用した。次に、pUCNTにクローニングされていたphaCac149NSを鋳型にして、配列番号26と27のプライマーを用いて遺伝子増幅し、pSTARRのNdeI、PstIサイトに結合させ、pSTARR-phaCac149NSを構築した。配列番号28から32のプライマーを使用し、塩基配列を確認した。塩基配列決定は、PERIKIN ELMER APPLIED BIOSYSTEMS社製のDNAシーケンサー310 Genetic Analyzerを用いた。

【0102】

次に、化学合成したキャンディダ・マルトーサ用にコドンを変換した配列番号3に記載のラルストニア・ユートロファ (Ralstonia eutropha、H16株、ATCC17699) 由来のアセトアセチルCoA還元酵素遺伝子 (phbB) のカルボキシ末端に、ペルオキシソーム配向シグナルを配列番号33及び34に記載のプライマーで増幅することにより付加し、次に、実施例5に記載のpSTARRのNdeI、PstIサイトに結合させ、pSTARR-phbBを構築した。塩基配列は、上記と同様の方法で確認した。

【0103】

キャンディダ・マルトーサ用ベクターであるpUTA-1のSalIサイトに、pSTARR-ORF2S149NSよりSalIとXhoIで切り出した合成酵素発現カセットを2個導入し、pARR-149NSx2を作成した。

更に、このベクターのSalIサイトに、pSTARR-phbBよりSalIとXhoIで切り出したphbB発現カセットを1個導入し、pARR-149NSx2-phbBを作成した。

【0104】

(実施例6) 組換え株の構築

キャンディダ・マルトーサの染色体上の破壊されたHIS5遺伝子部分に、異種遺伝子を導入するための導入用DNAを、実施例1に記載のHIS5破壊用DNAを用いて作成した。HIS5破壊用DNAをSalIとXhoIで切断し、ADE1遺伝子を除去し、代わりにpUTU-del salからSalIとXhoIで切断したURA3遺伝子を導入したプラスミドを作成した。このベクターのSalIサイトに、実施例5で作成したpSTARR-phaCac149NSよりSalIとXhoIで発現カセットを切り出し、結合させた。次に、このプラスミドのXhoIサイトに、pSTARR-phaCac149NSよりSalIとXhoIで発現カセットを切り出し結合させ、導入用DNA-1を含むプラスミドを作成した。

さらにpSTARR-phbBよりSalIとXhoIで切り出したphbB発現カセットを、導入用DNA-1を含むプラスミドのXhoIサイトに結合させ、導入用DNA-2を含むプラスミドを作成した。

【0105】

キャンディダ・マルトーサの染色体上の破壊されたURA3遺伝子部分に、異種遺伝子を導入するための導入用DNAを、実施例1に記載のURA3破壊用DNA-1を含むプラスミドを用いて作成した。URA3破壊用DNA-1を含むプラスミドのSalI-XhoIサイトに、配列番号35及び36に記載のプライマーでPCR増幅したHIS5遺伝子を導入したプラスミドを作成した。このプラスミドのSalIサイトに、実施例5で作成したpSTARR-phaCac149NSよりSalIとXhoIで発現カセットを切り出し、結合させた。次に、このベクターのXhoIサイトに、pSTARR-phbBよりSalIとXhoIで発現カセットを切り出し、結合させ、導入用DNA-3を含むプラスミドを作成した。

【0106】

実施例3において作成したキャンディダ・マルトーサAHU-71株を用い、実施例2に記載の方法で電気導入用コンピテント細胞を調製した。このコンピテント細胞に、制限酵

素N o t IとS w a Iで処理した0.05mgの導入用DNA-1及び2を電気導入し、アデニン及びウリジン含有SDプレートにスプレッドした。出現したコロニーより染色体DNAを調製し、配列番号23及び24で示されるプライマーを用いてPCRを行った。破壊されたH I S 5遺伝子に相当する1.9kbpの遺伝子の他に、導入用DNA-1及び2に相当する大きさの遺伝子が増幅するコロニーをH I S 5遺伝子部位に導入された株として選択した。

次に、これらの株より、同様に電気導入用コンピテント細胞を調製した。このコンピテント細胞に、制限酵素N o t IとS w a Iで処理した0.05mgの導入用DNA-3を電気導入し、アデニン含有SDプレートにスプレッドした。出現したコロニーより染色体DNAを調製し、配列番号19及び20で示されるプライマーを用いてPCRを行った。破壊されたU R A 3遺伝子に相当する0.7kbp及び1.2kbpの遺伝子の内、どちらかの遺伝子が増幅を認めず、代わりに導入用DNA-3に相当する大きさの遺伝子が増幅するコロニーをU R A 3遺伝子部位に導入された株として選択した。更に、種々のプライマーを用いたPCRにより、これら導入した遺伝子に欠失がないこと等を確認した。

【0107】

導入用DNA-1と3を用いて作成した、染色体上にp h a C a c 1 4 9 N S発現カセットが3コピー、p h b B発現カセットが1コピー挿入された株をA株とした。導入用DNA-2と3を用いて、染色体上にp h a C a c 1 4 9 N S発現カセットが3コピー、p h b B発現カセットが2コピー挿入された株をB株とした。最後に、p A R R - 1 4 9 N S x 2 - p h b Bをこれらに形質転換し、p h a C a c 1 4 9 N S発現カセットが5コピー、p h b B発現カセットが2コピー導入されたC株、及び、p h a C a c 1 4 9 N S発現カセットが5コピー、p h b B発現カセットが3コピー導入された株されたD株を作成した。

同様に、コントローラー1～3として、A C 1 6株に、p U T A - 1、p A R R - p h a C a c 1 4 9 N S x 2、p A R R - p h a C a c 1 4 9 N S x 2 - p h b Bをそれぞれ形質転換した株も作成した。作成した株の概要を表1に示した。

【0108】

【表1】

	宿主	プラスミド	染色体組み込み		発現セット合計数	
			HIS座	URA3座	phaC	phbB
control-1	AC16	pUTA-1	なし	なし	0	0
control-2	AC16	pARR-phaCac149NSx2	なし	なし	2	0
control-3	AC16	pARR-phaCac149NSx2-phbB	なし	なし	2	1
A	AHU-71	pUTA-1	導入用DNA-1	導入用DNA-3	3	1
B	AHU-71	pUTA-1	導入用DNA-2	導入用DNA-3	3	2
C	AHU-71	pARR-phaCac149NSx2-phbB	導入用DNA-1	導入用DNA-3	5	2
D	AHU-71	pARR-phaCac149NSx2-phbB	導入用DNA-2	導入用DNA-3	5	3

【0109】

(実施例7) 組換え株を使用したポリマー生産

ポリマー生産に必要な遺伝子を導入したキャンディダ・マルトーサ組換え株を次のように培養した。培地はSD培地を前培養に、炭素源としてバーム核油を含むM2培地を生産培地として使用した。各組換え株のグリセロールストック500μlを、50mlの前培地が入った500ml坂口フラスコに接種して、20時間培養し、300mLの生産培地を入れた2L坂口フラスコに10v/v%接種した。これを培養温度30℃、振盪速度90rpm、2日間培養という条件で培養した。培養液から、遠心分離によって菌体を回収し、80mlの蒸留水に懸濁して超高压ホモジナイザー（APV社製、Rannie2000、15000Psiで15分間）で破碎した後、遠心分離を行い、得られた沈殿物をメタノールで洗浄した後、凍結乾燥した。得られた乾燥菌体を粉碎し、1gを秤量した。これに、クロロホルムを100ml添加し、一晚攪拌して抽出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで10mlにまで濃縮し、濃縮液に約50mlのヘキサンを添加

して、ポリマーを析出させた。得られたポリマーは、NMR分析（J E O L、J N M-E X 4 0 0）にて組成分析を行った。

また、比較例として、上記実施例6の表1で用いたコントロール1～3を用いた。結果を表2に示した。

【0110】

【表2】

	ポリマー含量 (wt%)	3HH分率 (mol%)
control-1	0	—
control-2	14	—
control-3	25	18.1
A	31	18.9
B	40	14.3
C	43	15.5
D	45	14.6

【0111】

上記結果より、本発明の新規遺伝子破壊酵母を用いることにより、極めて効率的にP H Aを生産できることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0112】

本発明の遺伝子破壊によって作成された複数のマーカーを有する酵母は、遺伝子組換え用宿主として、高効率な遺伝子発現や遺伝子の発現産物の製造に用いることが期待できる。また、本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを、酵母において効率的に生産することが可能になった。さらに、遺伝子破壊によるマーカーを付加することも可能であり、より優れた宿主の開発に繋がる。

【図面の簡単な説明】

【0113】

【図1】 実施例において作成した破壊用D N Aの簡単な模式図である。

【図2】 新規遺伝子破壊酵母の増殖性を比較した図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 鐘淵化学工業 KANEKA CORPORATION

<120> 新規遺伝子破壊酵母

<130> B040069

<160> 36

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

aagctgcggc cgcagcttgc atgcctgcag gtcgactcta gaggatcctc gaggatcccc 60

gggtacgcta gcgtaccgag ctatccatit aaatccgaat tc 102

<210> 2

<211> 1785

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

atgtctcaac catcttatgg tccattgttc gaagctttgg ctcattacaa tgataaattg 60

ttggctatgg ctaaagctca aaccgaaaga actgctcaag ccttgttgca aactaacttg 120

gatgatttgg gtcaagtttt ggaacaaggt tctcaacaac catggcaatt gattcaagct 180

caaatgaatt ggtggcaaga tcaattaaaa ttgatgcaac acactttggt aaaatctgct 240

gggtcaaccat ctgaaccagt tattactcca gaaagatctg atagaagatt taaagctgaa 300

gcttggctctg aacaaccaat ttatgattac ttaaaacaat cctattttgtt aactgctaga 360

catittgttgg cttctgttga tgctttggaa ggtgtccac aaaaatctag agaaagattg 420

agattcttta ctagacaata cgtctccgct atggctccat ctaatttctt ggctactaac	480
ccagaattgt taaaattgae tttggaatcc gatgggtcaaa atttggtttag aggtttggct	540
ttattggctg aagatttggga aagatctgct gatcaattaa acattagatt gactgatgaa	600
tccgcttttg aattaggttag agatttggct ttgactccag gtagagttgt tcaaagaact	660
gaattatatg aattaattca atactctcca actactgaaa ccgttggtaa aaccccagtt	720
ttgatcgttc caccattcat taataaatat tacattatgg atatgagacc acaaaactcc	780
ttggtcgctt ggttggtcgc tcaagggtcaa accgttttca tgatttcctg gagaaaccca	840
ggtgttgctc aagctcaa attgatttagat gattatgttg ttgatgggtg cattgctgct	900
ttggatggtg ttgaagccgc tactggtgaa agagaagttc acggtattgg ttactgtatt	960
ggtggtaaccg ctttgtcttt agctatgggt tggttggccg ccagaagaca aaaacaaaga	1020
gttagaactg ctactttgtt tactactttg ttggatttct cccaaccagg tgaattgggt	1080
atttttattc atgaaccaat tatcgccgcc ttagaagccc aaaatgaagc taaagggtatt	1140
atggatggta gacaattggc cgtctccttc tctttgttga gagaaaactc tttatatatgg	1200
aattactata ttgattctta cttaaaaggt caatctccag ttgcttttga tttgttgcac	1260
tggaactctg attctactaa tgttgccggt aaaactcata actctttgtt gagaagatta	1320
tattttgaaa atcaattgggt taaagggtgaa ttaaaaatta gaaacactag aattgattta	1380
ggtaaaagtta aaactccagt tttgttggtt tctgccgttg atgacacat tgctttatgg	1440
caaggtaacct ggcaagggtat gaaattgttc ggtgggtgaac aaagatTTTT attggccgaa	1500
tccggtcata ttgctgggtat tattaatcca ccagctgcta acaaataccg tttctggcac	1560
aatggtgctg aagctgaatc tccagaatct tggttggctg gtgccacca tcaagggtgt	1620
tcctgggtggc cagaaatgat gggttttatt caaaacagag atgaaggttc tgaaccagtc	1680
ccagccagag tcccagaaga aggtttggct ccagctccag gtcactatgt caaagttaga	1740
ttaaacccag ttttcgcttg tccaaccgaa gaagatgctg cttaa	1785

<210> 3

<211> 741

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 3
atgactcaaa gaattgccta cgttactggt ggtatgggtg gtattgggtac tgctatttgt 60
caaagattgg ctaaagatgg ttttagagtt gttgctggtt gtgggtccaaa ctctccaaga 120
agagaaaaat ggttggaaaca aaaaaaagct ttgggtttcg attttattgc ttctgaagggt 180
aatgttgctg attgggattc tactaaaaact gctttcgata aagtcaaadc cgaagtcggt 240
gaagttgatg ttttgattaa caatgctggt attactagag atgttgtttt tagaaaaatg 300
actagagctg attgggatgc cgttattgat actaacttga cttctttgtt caatgtcact 360
aaacaagtta ttgatgggat ggctgataga ggttggggta gaattgtcaa catttcttct 420
gttaatgggtc aaaaagggtca atttgggtcaa actaactatt ccactgctaa agctgggttg 480
catggtttca ctatggcttt ggcccaagaa gttgccacta aagggtgttac tgtcaatacc 540
gtctctccag gttacattgc tactgatatg gtcaaagcca ttagacaaga tgtttttagat 600
aaaattgtcg ccaccattcc agtcaaaaaga ttgggtttgc cagaagaaat tgcttctatt 660
tgtgcttggt tgtcttctga agaatccggt ttttctactg gtgctgattt ctcttttaaac 720
ggtggtttgc acatgggtta a 741

<210> 4
<211> 754
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 4
aagcttgcat gcctgcagggt cgaaattcga gctcgggtacc cggggatcct ctagagtcca 60
tgtgcttttt tttttgtttt caatttgaaa gtttttttat ttccgcaata caaaattatt 120
ttttatccgc tcatgtgcct ttttttttgt tttcaatttg aaagtttttt tatttccgca 180
atacaaaatt attttttatt cgctgaccca gatcctctag agtccatgtg cttttttttt 240

tgttttcaat ttgaaagttt ttttatttcc gcaatacaaa attatTTTTT atccgctcat	300
gtgctTTTTT ttttgTTTTt aatttgaaag tttttttatt tccgcaatac aaaattattt	360
tttatccgct gacccagate ctctagagtc catgtgcttt tttttttggt ttcaatttga	420
aagttttttt atttccgcaa tacaaaaatta ttttttatcc gctcatgtgc tttttttttt	480
gttttcaatt tgaaagtttt tttatttccg caatacaaaa ttatTTTTTa tccgctgacc	540
cagatctcga ctctagagga tccccgtttt tttatttccg caatacaaaa ttatTTTTTa	600
tccgctttcc gttcctttct tcttgTgata aatctcaaca attatatata tcattccata	660
accctgaata attttttttt taagtccttg gtttcttttt ttagaaaaaa aggtgaatca	720
gtaaaaatttt tgttatttat catTTtaact caca	754

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 5	
ctctgtgcat cagtgGacgt tcaaaccaca	30

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 6	
tgtggtttga acgtccactg atgcacagag	30

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

aattgcatgc cagtactttt ttgtgtaaca ttcaac

35

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

aattgtcgcac atgaaaagtc gtcgattatg

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

aattgctagc caagggggttt gttgatgttg

30

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

ttaattaatt taaataattt cgaagattac gatgaagt

38

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 11
aat t g t c g a c t a a c a g t a t g a t t t t t t t c c t c t 34

<210> 12
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
a a t t c t c g a g a a c a a a c c a a a t g a t c t t g t c g t g 34

<210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
a a t t c t c g a g t a a c a g t a t g a t t t t t t t c c t c t 34

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
a a t t g c t a g c a a t t g g c a a g a a a t c a a a c c a 31

<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
a a t t g c a t g c g g t c c a c a c t a a g a a a t g t t t 31

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
aattgtcgcac agcttaatgt ttggatcaga 30

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17
aattgctagc agatttaggg gttctgaatt g 31

<210> 18
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 18
ttaattaatt taaatcaaat tgttgacctt tgttc 35

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 19
atggtatcca ccaaacata cacc 24

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 20
aatttcgaag attacgatga agtt

24

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 21
taacagtatg atttttttcc ctct

24

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 22
aacaaaccaa atgatcttgt cgtg

24

<210> 23
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 23
aattgtcgaac aattcattat tacagagtaa gatttggt

38

<210> 24
<211> 23

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 24
ttctgtgctg ttggtgattt cat 23

<210> 25
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 25
gtccttgggtt tcttttttta gaaaaaaagg tgaatcagta aaatttttgt tatttatcat 60

tttaactcac atatgaagat atc 83

<210> 26
<211> 99
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 26
acacatatgt ctcaaccate ttatgggtcca ttgttcgaag ctttgggtca ttacaatgat 60

aaattgttgg ctatggctaa agctcaaacc gaaagaact 99

<210> 27
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 27
atgggtactgc agttacaatt tagaagcagc atcttcttcg gttgg 45

<210> 28
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 28
ccggaattca tatgactcaa agaattgcct a 31

<210> 29
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 29
ctgcagttac aatttagaac ccatgtgcaa accaccgtt 39

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
actaacttgg atgatttggg tc 22

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31
ctaatttctt ggctactaac cc 22

<210> 32
<211> 22

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
agttttgatc gttccaccat tc 22

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33
catgaaccaa ttatcgccgc 20

<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 34
gttggtttct gccgttgatg at 22

<210> 35
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 35
aatgttcgac ggtccacact aagaaatgtt t 31

<210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 36

aattctcgag caaattgttg acctttgttc

30

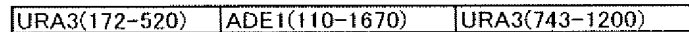
【書類名】 図面

【図 1】

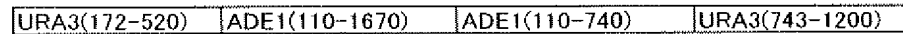
URA3破壊用DNA-1



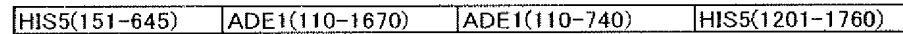
URA3破壊用DNA-2



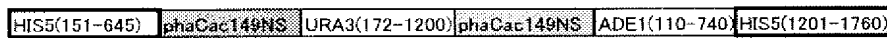
URA3破壊用DNA-3



HIS5破壊用DNA



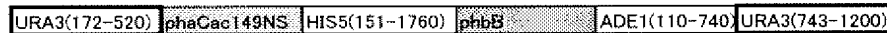
導入用DNA-1



導入用DNA-2

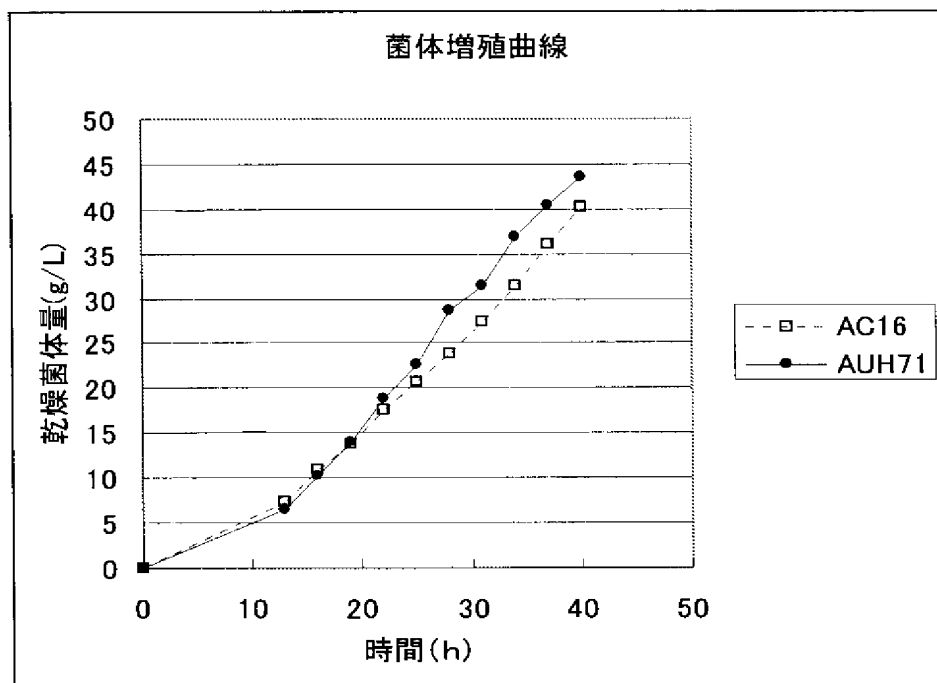


導入用DNA-3



括弧内の数字は、それぞれ用いた遺伝子断片のGenBankに登録されている遺伝子の5'末端からの番号を示している。ADE1遺伝子：D00855、URA3遺伝子：D12720、HIS5遺伝子：X17310

【圖 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 菌体生産性に優れ、遺伝子操作の容易な、ある特定の遺伝子のみを破壊して栄養要求性を付加した酵母を提供する。また、遺伝子発現産物、特にポリヒドロキシアルカン酸の製造方法を提供する。

【解決手段】 相同的組換えを利用して、複数の遺伝子が破壊された酵母を作成する。また、当該遺伝子破壊酵母に、ポリヒドロキシアルカン酸の合成に関与する酵素遺伝子を複数導入して形質転換体を得る。さらに、当該形質転換体を培養し、効率的にポリヒドロキシアルカン酸よりなる共重合ポリエステルを菌体内に蓄積させ、その培養物よりポリマーを採取する。

【選択図】 なし

[illegible]



国際様式 INTERNATIONAL FORM

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称)

鐘淵化学工業株式会社

代表取締役 武田 正利

寄託者

あて 名 〒

大阪市北区中之島三丁目二番四号

【添付書類】



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Candida maltosa AC16	(受託番号) FERM BP- 7366
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 12 年 11 月 15 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所長 大賀 信一 Dr. Shinichi Ohgaki Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 12 年 (2000) 11 月 15 日	

【物件名】

受託証の写し

書式7(第7条関係)

【添付書類】



受 託 証

通知番号 : 03 産生寄 第 991 号

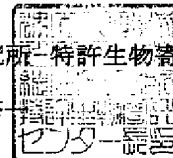
通知年月日 : 平成 15 年 7 月 18 日

鐘淵化学工業株式会社
代表取締役 武田 正利

殿

独立行政法人産業技術総合研究所-特許生物寄託センター長

岡 修



1. 微生物の識別のための表示	
(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
U-35	FERM P- 19435
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当センターは、平成 15 年 7 月 18 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

【物件名】

受託証の写し

【添付書類】



088

書式7(第7条関係)

受 託 証

通知番号 : 03 産生寄 第 990 号

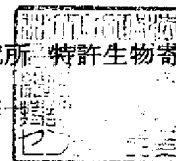
通知年月日 : 平成 15 年 7 月 18 日

鐘淵化学工業株式会社
代表取締役 武田 正利

殿

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター長

岡 修



1. 微生物の識別のための表示	
(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
CH-I	FERM P- 19434
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当センターは、平成 15 年 7 月 18 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

【物件名】

受託証の写し

【添付書類】



088

書式7(第7条関係)

受 託 証

通知番号 : 03 産生寄 第 992 号

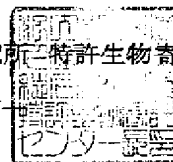
通知年月日: 平成 15 年 7 月 18 日

鐘淵化学工業株式会社
代表取締役 武田 正利

殿

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター長

岡 修



1. 微生物の識別のための表示	
(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
UA-354	FERM P- 19436
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質	
<input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当センターは、平成 15 年 7 月 18 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

【物件名】

受託証の写し

【添付書類】



288

1

書式7(第7条関係)

受 託 証

通知番号 : 03 産生寄 第 989 号

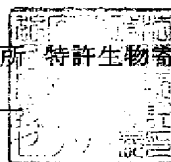
通知年月日 : 平成 15 年 7 月 18 日

鐘淵化学工業株式会社
代表取締役 武田 正利

殿

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター長

岡 修



1. 微生物の識別のための表示	
(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
AH-I5	FERM P- 19433
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質	
<input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当センターは、平成 15 年 7 月 18 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

【物件名】

受託証の写し

【添付書類】

書式7(第7条関係)

085

受 託 証

通知番号 : 15 産生寄 第 1333 号

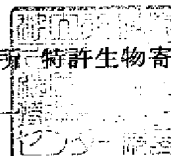
通知年月日 : 平成 15 年 10 月 1 日

鐘淵化学工業株式会社
代表取締役 武田 正利

殿

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター長

岡 修



1. 微生物の識別のための表示	
(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
HU-591	FERM P- 19545
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質	
<input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当センターは、平成 15 年 10 月 1 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

【物件名】

受託証の写し

【添付書類】

書式7(第7条関係)



受 託 証

通知番号 : 15 産生寄 第 1140 号

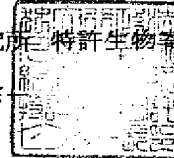
通知年月日 : 平成 15 年 8 月 15 日

鐘淵化学工業株式会社
代表取締役 武田 正利

殿

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター長

岡 修



1. 微生物の識別のための表示	
(寄託者が付した識別のための表示)	(受託番号)
AHU-71	FERM P- 19492
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質	
<input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当センターは、平成 15 年 8 月 15 日に受領した1欄の微生物を受託する。	

出願人履歴

0 0 0 0 0 0 9 4 1

19900827

新規登録

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

鐘淵化学工業株式会社

0 0 0 0 0 0 9 4 1

20040901

名称変更

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

株式会社カネカ